

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA ŽIVILSTVO

Ivana Basić

**PROTIMIKROBNO DELOVANJE EKSTRAKTOV ROŽMARINA
NA BAKTERIJE RODU *Campylobacter***

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

**ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF ROSMARY EXTRACTS
(*Rosmarinus officinalis* L.) AGAINST *Campylobacter* sp.**

GRADUATION THESIS
University studies

Ljubljana, 2006

Diplomsko delo je zaključek univerzitetnega študija živilske tehnologije. Opravljeno je bilo v laboratorijih Katedre za živilsko mikrobiologijo na Oddelku za živilstvo Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani.

Študijska komisija Oddelka za živilstvo je za mentorico diplomskega dela imenovala prof. dr. Sonjo Smole Možina in za recenzentko prof. dr. Veroniko Abram.

Mentorica: prof. dr. Sonja Smole Možina

Recenzentka: prof. dr. Veronika Abram

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik:

Član:

Član:

Datum zagovora:

Naloga je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Ivana Basić

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

- ŠD Dn
DK UDK 579.67+579.24:547.9(043)=836
KG patogeni mikroorganizmi/*Campylobacter*/rast mikroorganizmov/ekstrakt rožmarina/protimikrobno delovanje/karnozolna kislina/ obrambni mehanizmi/ minimalna inhibitorna koncentracija
AV BASIĆ, Ivana
SA SMOLE MOŽINA, Sonja (mentorica)/ABRAM, Veronika (recenzentka)
KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo
LI 2006
IN PROTIMIKROBNO DELOVANJE EKSTRAKTOV ROŽMARINA NA BAKTERIJE RODU *Campylobacter*
TD Diplomsko delo (univerzitetni študij)
OP XI, 63 str., 21 pregl., 29 sl., 91 vir.
IJ sl
JI sl/en
- AI V diplomski nalogi smo z uporabo štirih različnih metod (difuzijske in dilucijske metode v agarju ter makrodilucijske in mikrodilucijske metode v bujonu) ugotavljali protimikrobno aktivnost ekstraktov rožmarina na bakterije *Campylobacter*. Želeli smo izbrati optimalno metodo in jo uporabiti za določitev minimalne inhibitorne koncentracije (MIC) ekstraktov rožmarina, ki inhibirajo rast različnih sevov bakterij *Campylobacter*. Uporabili smo seve živalskega, živilskega in humanega izvora z znanimi podatki o odpornosti proti nekaterim antibiotikom. Namen dela je bil preučiti tudi morebitno zvezo med odpornostjo proti antibiotikom in rastlinskim ekstraktom. Uporabili smo dva ekstrakta rožmarina z različno vsebnostjo karnozolne kisline (Ros.con in Ros.conh). Celice testnih kultur smo pripravili v tekočem gojišču Preston. Koncentracije ekstraktov smo pripravili glede na preučevano metodo. Pri vseh metodah smo kulturo inkubirali na trdnem ali v tekočem gojišču Mueller Hinton ali Preston z dodatkom ekstrakta, 24 do 48 ur pri 42 °C. Po inkubaciji smo odčitali rast bakterij. Kot vrednost MIC smo šteli tisto koncentracijo, pri kateri ni bilo vidne rasti bakterij na oz. v gojišču. Ugotovili smo, da so rezultati difuzijske in dilucijske metode v agarju težko primerljivi. Makrodilucijska metoda v bujonu je v večini primerov potrdila minimalne inhibitorne koncentracije dilucijske metode v agarju. S slednjo smo pri 63 sevih določili vrednost MIC v območju od 1,25 mg/ml do 20 mg/ml ekstraktov Ros.con in Ros.conh v gojišču, v povprečju 6,65 mg/ml Ros.con in 5,60 mg/ml Ros.conh v rastnem mediju. Z mikrodilucijsko metodo, ki smo jo uporabili na manjšem številu sevov, smo izmerili nekoliko višje vrednosti MIC, kar bi bilo potrebno nadalje preučiti. Pri preučevanju morebitne povezave med odpornostjo sevov proti antibiotikoma ciprofloksacin in eritromicin ter odpornostjo proti delovanju ekstrakta rožmarina nismo ugotovili direktne povezave.

KEY WORDS DOCUMENTATION

- DN Dn
DC UDC 579.67+579.24:547.9(043)=836
CX pathogens/*Campylobacter*/growth of microorganisms/ rosemary extracts/ antimicrobial activity/ carnosic acid/ resistance mechanisms /minimal inhibitory concentration
AU BASIĆ, Ivana
AA SMOLE MOŽINA, Sonja (supervisor)/ABRAM, Veronika (reviewer)
PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Food Science and Technology
PY 2006
TI ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF ROSEMARY EXTRACTS (*Rosmarinus officinalis* L.) AGAINST *Campylobacter* sp.
DT Graduation thesis (University studies)
NO XI, 63 p., 21 tab., 29 fig., 91 ref.
LA sl
AL sl/en
- AB We studied antimicrobial activity of rosemary extracts (*Rosmarinus officinalis* L.) against *Campylobacter* sp. with four different methods: agar diffusion method, agar dilution method, macrodilution and microbroth dilution method – with the aim to select the optimal method for minimal inhibitory concentration (MIC) determination. We have tested different strains of animal, food and human origin with known information regarding their resistance to certain antibiotics. The additional purpose of this work was to confirm any connection between the resistances of strains against selected antibiotics and tested herbal extracts. We have used two extracts of rosemary containing different levels of carnosic acid (Ros.con and Ros.conh). All tested cultures were prepared in a Preston broth. The concentrations of extracts were prepared in accordance with the studied method. In all methods, the culture were incubated on a solid or liquid Mueller Hinton or Preston medium with addition of plant extract, for 24 to 48 hours at the temperature of 42 °C. After the incubation, the level of bacterial growth was recorded. The lowest concentrations, where no visible bacterial growth was recorded, were assumed as MIC values. We have established, that the results between the diffusion and agar dilution methods are difficult to compare. The macrodilution method in a liquid medium in most cases confirmed the minimal inhibitory concentrations of the agar dilution method. For 63 tested strains, we determined MIC values in the range from 1.25 mg/ml to 20 mg/ml Ros.con and Ros.conh in the medium, with the average MIC value of 6.65 mg/ml and 5.60 mg/ml, respectively. The microbroth dilution method, which was tested with the lower number of strains, has provided slightly higher MIC values. This should be further studied with a larger number of strains. The study of a possible link between the microbial resistance/sensitivity to selected antibiotics and tested rosemary extracts has not confirmed any direct connection.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA.....	III
KEY WORDS DOCUMENTATION.....	IV
KAZALO VSEBINE.....	V
KAZALO PREGLEDNIC.....	VIII
KAZALO SLIK.....	IX
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI.....	XI
1 UVOD.....	1
2 PREGLED OBJAV.....	2
2.1 RASTLINSKI EKSTRAKTI KOT NARAVNA PROTIMIKROBNA SREDSTVA.....	2
2.1.1 Protimikrobne spojine v rastlinah.....	3
2.1.1.1 Enostavni fenoli in fenolne kisline.....	3
2.1.1.2 Flavoni, flavonoidi in flavonoli.....	4
2.1.1.3 Kinoni.....	4
2.1.1.4 Tanini.....	4
2.1.1.5 Kumarini.....	4
2.1.1.6 Terpenoidi in eterična olja.....	4
2.1.2 Rožmarin.....	5
2.1.2.1 Protimikrobno delovanje rožmarina in njegovih sestavin.....	5
2.1.2.2 Karnozolna kislina in karnozol.....	7
2.1.2.3 Rožmarinska kislina.....	9
2.2 BAKTERIJE <i>Campylobacter</i>.....	9
2.2.1 Taksonomska razvrstitev ter ekološke in genetske značilnosti.....	9
2.2.2 Epidemiologija in patogeneza kampilobakterioz.....	11
2.3 RAZVOJ BAKTERIJSKE ODPORNOSTI.....	12
2.3.1 Mehanizmi bakterijske odpornosti proti antibiotikom in drugim protimikrobnim snovem.....	13
2.3.2 Odpornost bakterij iz rodu <i>Campylobacter</i> proti kemijskim protimikrobnim snovem.....	13
2.3.3 Mehanizem odpornosti bakterij rodu <i>Campylobacter</i> proti protimikrobnim snovem.....	15
2.4 METODE UGOTAVLJANJA PROTIMIKROBNE UČINKOVITOSTI.....	16
2.4.1 Difuzijske metode.....	16
2.4.1.1 Difuzijske metode z diski in luknjicami.....	16
2.4.2 Dilucijske metode.....	17
2.4.2.1 Dilucijske metode v agarju.....	17
2.4.2.2 Makrodilucija v bujonu.....	18
2.4.2.3 Mikrodilucija v bujonu.....	18
2.4.3 Kinetika rasti ali odmiranja.....	18
2.4.4 Drugi načini.....	18

2.5 CILJI DIPLOMSKE NALOGE.....	19
2.6 DELOVNE HIPOTEZE.....	19
3 MATERIAL IN METODE DELA.....	20
3.1 POTEK DELA.....	20
3.2 MATERIAL.....	21
3.2.1 Mikroorganizmi.....	21
3.2.2 Mikrobiološka gojišča.....	21
3.2.2.1 Tekoče gojišče Preston.....	21
3.2.2.2 Krvni agar Columbia.....	22
3.2.2.3 Agar Karmali.....	22
3.2.2.4 Agar CCDA.....	23
3.2.2.5 Krvni agar Mueller Hinton.....	24
3.2.2.6 Tekoče gojišče Mueller Hinton.....	24
3.2.3 Raztopine in dodatki.....	25
3.2.3.1 Fiziološka raztopina.....	25
3.2.3.2 Dodatki.....	25
3.2.4 Priprava ekstraktov.....	25
3.2.4.1 Ekstrakti.....	25
3.2.4.2 Priprava ustreznih koncentracij ekstrakta rožmarina.....	25
3.2.5 Laboratorijska oprema.....	25
3.3 METODE DELA.....	26
3.3.1 Revitalizacija bakterij.....	26
3.3.2 Priprava inokuluma.....	26
3.3.3 Določanje koncentracije celic v inokulumu.....	27
3.3.4 Difuzijska metoda ugotavljanja protimikrobnega delovanja ekstraktov.....	28
3.3.4.1 Priprava materiala.....	28
3.3.4.2 Priprava ustreznih koncentracij ekstrakta rožmarina.....	28
3.3.4.3 Izvedba metode.....	28
3.3.5 Dilucijska metoda v agarju.....	28
3.3.5.1 Priprava materiala.....	28
3.3.5.2 Priprava ustreznih koncentracij ekstrakta rožmarina v gojišču.....	28
3.3.5.3 Izvedba metode.....	29
3.3.6 Makrodilucijska metoda v bujonu – Ugotavljanje kinetike protimikrobnega delovanja ekstraktov rožmarina pri bakterijah <i>Campylobacter</i>.....	29
3.3.6.1 Priprava materiala.....	29
3.3.6.2 Priprava ustreznih koncentracij ekstrakta rožmarina v gojišču.....	29
3.3.6.3 Izvedba metode.....	29
3.3.7 Mikrodilucijska metoda v bujonu.....	30
3.3.7.1 Priprava materiala.....	30
3.3.7.2 Priprava ustreznih koncentracij ekstrakta rožmarina v gojišču.....	30
3.3.7.3 Izvedba metode.....	30
3.3.8 Statistična obdelava rezultatov	
3.3.8.1 Povprečna vrednost.....	31

4 REZULTATI.....	32
4.1 REZULTATI DIFUZIJSKE METODE V AGARJU.....	32
4.2 REZULTATI DILUCIJSKE METODE V AGARJU.....	33
4.3 REZULTATI MAKRODILUCIJSKE METODE V TEKOČEM RASTNEM MEDIJU – UGOTAVLJANJE KINETIKE PROTIMIKROBNEGA DELOVANJA EKSTRAKTOV ROŽMARINA PRI BAKTERIJAH <i>Campylobacter</i>	38
4.4 REZULTATI MIKRODILUCIJSKE METODE V BUJONU.....	46
5 RAZPRAVA IN SKLEPI.....	49
5.1 RAZPRAVA.....	49
5.1.1 Metoda difuzije v agarju z luknjicami.....	50
5.1.2 Dilucijska metoda v agarju.....	50
5.1.3 Primerjava rezultatov difuzijske in dilucijske metode v agarju.....	51
5.1.4 Kinetika protimikrobnega delovanja ekstraktov rožmarina pri bakterijah <i>Campylobacter</i>	51
5.1.5 Mikrodilucijska metoda v bujonu.....	52
5.2 SKLEPI.....	54
6 POVZETEK	55
7 VIRI.....	57
ZAHVALA	

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1:	Prevladujoče hlapne in nehlapne komponente v ekstraktih različnih rastlin družine ustnatic (Lamiceae) (Petauer, 1993; Cowan, 1999; Araujo in sod., 2003; Burt, 2004; Hadolin, 2004; Lopez-Malo Vigil in sod., 2005).....	6
Preglednica 2:	Količina rožmarinske kisline, karnozolne kisline in karnozola v ekstraktih rožmarina pridobljenih z različnimi topili (Moreno in sod., 2006).....	7
Preglednica 3:	Sestava osnovnega medija za tekoče gojišče Preston.....	21
Preglednica 4:	Sestava dodatka za rast <i>Campylobacter</i> Growth Supplement (Oxoid, SR232E).....	21
Preglednica 5:	Sestava dodatka za selektivnost <i>Campylobacter</i> Selective Supplement (Oxoid, SR204E).....	21
Preglednica 6:	Sestava osnovnega medija za krvni agar Columbia.....	22
Preglednica 7:	Sestava dodatka za selektivnost <i>Campylobacter</i> Selective Supplement (Oxoid, SR069E).....	22
Preglednica 8:	Sestava osnovnega medija za agar Karmali.....	23
Preglednica 9:	Sestava dodatka za selektivnost Karmali Selective Supplement (Biokar Diagnostic, SM017).....	23
Preglednica 10:	Sestava osnovnega medija za agar CCDA.....	23
Preglednica 11:	Sestava dodatka za selektivnost CCDA Selective Supplement (Oxoid, SR155E).....	23
Preglednica 12:	Sestava osnovnega medija za krvni agar Mueller Hinton.....	24
Preglednica 13:	Sestava osnovnega medija za bujon Mueller Hinton.....	24
Preglednica 14:	Rezultati protimikrobnega delovanja ekstraktov rožmarina z difuzijsko metodo.....	32
Preglednica 15:	Rezultati protimikrobnega delovanja ekstraktov rožmarina na bakterije <i>Campylobacter</i> z dilucijsko metodo v agarju.....	34
Preglednica 16:	Povprečne vrednosti minimalnih inhibitornih koncentracij ekstrakta rožmarina za bakterije <i>Campylobacter</i> glede na izvor izolata.....	35
Preglednica 17:	Povprečne vrednosti minimalnih inhibitornih koncentracij ekstrakta rožmarina za bakterije <i>Campylobacter</i> glede na vrsto izolata.....	35
Preglednica 18:	Povprečne vrednosti minimalnih inhibitornih koncentracij ekstraktov Ros.con in Ros.conh za bakterije <i>Campylobacter</i> glede na občutljivost (S) oz. odpornost (R) na antibiotik ciprofloksacin.....	36
Preglednica 19:	Povprečne vrednosti minimalnih inhibitornih koncentracij ekstraktov Ros.con in Ros.conh za bakterije vrst <i>C. coli</i> in <i>C. jejuni</i> glede na občutljivost (S) oz. odpornost (R) na antibiotik ciprofloksacin.....	36
Preglednica 20:	Povprečne vrednosti minimalnih inhibitornih koncentracij ekstraktov Ros.con in Ros.conh za bakterije <i>Campylobacter</i> glede na občutljivost (S) oz. odpornost (R) na antibiotik eritromicin.....	37
Preglednica 21:	Povprečne vrednosti minimalnih inhibitornih koncentracij ekstraktov Ros.con in Ros.conh za bakterije vrst <i>C. coli</i> in <i>C. jejuni</i> glede na občutljivost (S) oz. odpornost (R) na antibiotik eritromicin.....	37

KAZALO SLIK

Slika 1: Posledice učinkovanja protimikrobnega rastlinskega izvlečka na bakterijsko celico (Burt, 2004).....	3
Slika 2: Kemijski strukturi karnozolne kisline in karnozola (Munne-Bosch in Alegre, 2001).....	8
Slika 3: Strukturna formula rožmarinske kisline (Makino in sod., 2000).....	9
Slika 4: <i>Campylobacter</i> (The <i>Campylobacter</i> information site, 2000).....	10
Slika 5: Prikaz izvajanja difuzijske metode v agarju z luknjicami.....	17
Slika 6: Shema poskusa.....	20
Slika 7: Prikaz precepljanja celične kulture s cepilno zanko v tekoče gojišče Preston.....	27
Slika 8: Prikaz precepljanja celične kulture s cepilno zanko v tekoče gojišče Preston.....	27
Slika 9: Kolonije bakterij <i>Campylobacter</i> na selektivnem gojišču Karmali.....	27
Slika 10: Kolonije bakterij <i>Campylobacter</i> na selektivnem gojišču Karmali.....	27
Slika 11: Rastna krivulja in krivulja odmiranja seva <i>C. jejuni</i> K29/1 med 24-urno inkubacijo v tekočem gojišču Preston z dodatkom ekstraktov rožmarina.....	38
Slika 12: Rastna krivulja in krivulja odmiranja seva <i>C. jejuni</i> K35/1 med 24-urno inkubacijo, pri 42 °C, v tekočem gojišču Preston z dodatkom ekstraktov rožmarina.....	39
Slika 13: Rastna krivulja in krivulja odmiranja seva <i>C. coli</i> K38/5 med 24-urno inkubacijo, pri 42 °C, v tekočem gojišču Preston z dodatkom ekstraktov rožmarina.....	39
Slika 14: Rastna krivulja in krivulja odmiranja seva <i>C. coli</i> 72P med 24-urno inkubacijo, pri 42 °C, v tekočem gojišču Preston z dodatkom ekstraktov rožmarina.....	40
Slika 15: Rastna krivulja in krivulja odmiranja seva <i>C. jejuni</i> 96/P med 24-urno inkubacijo, pri 42 °C, v tekočem gojišču Preston z dodatkom ekstraktov rožmarina.....	40
Slika 16: Rastna krivulja in krivulja odmiranja seva <i>C. coli</i> 100/P med 24-urno inkubacijo, pri 42 °C v tekočem gojišču Preston z dodatkom ekstraktov rožmarina.....	41
Slika 17: Rastna krivulja in krivulja odmiranja seva <i>C. coli</i> 16/F med 24-urno inkubacijo, pri 42 °C, v tekočem gojišču Preston z dodatkom ekstraktov rožmarina.....	41
Slika 18: Rastna krivulja in krivulja odmiranja seva <i>C. coli</i> 21/F med 24-urno inkubacijo, pri 42 °C, v tekočem gojišču Preston z dodatkom ekstraktov rožmarina.....	42
Slika 19: Rastna krivulja in krivulja odmiranja seva <i>C. coli</i> 49/F med 24-urno inkubacijo, pri 42 °C, v tekočem gojišču Preston z dodatkom ekstraktov rožmarina.....	42
Slika 20: Rastna krivulja in krivulja odmiranja seva <i>C. coli</i> 4442+Tween 80 med 24-urno inkubacijo, pri 42 °C, v tekočem gojišču Preston z dodatkom ekstraktov rožmarina.....	43
Slika 21: Rastna krivulja in krivulja odmiranja seva <i>C. coli</i> 4442 med 24-urno inkubacijo, pri 42 °C, v tekočem gojišču Preston z dodatkom ekstraktov rožmarina.....	43
Slika 22: Rastna krivulja in krivulja odmiranja seva <i>C. coli</i> 9249 med 24-urno inkubacijo, pri 42 °C, v tekočem gojišču Preston z dodatkom ekstraktov rožmarina.....	44

Slika 23: Rastna krivulja in krivulja odmiranja seva <i>C. jejuni</i> 28233 med 24-urno inkubacijo, pri 42 °C, v tekočem gojišču Preston z dodatkom ekstraktov rožmarina.....	44
Slika 24: Rastna krivulja in krivulja odmiranja seva <i>C. jejuni</i> 19809 med 24-urno inkubacijo, pri 42 °C, v tekočem gojišču Preston z dodatkom ekstraktov rožmarina.....	45
Slika 25: Ugotavljanje minimalne inhibitorne koncentracije ekstrakta Ros.conh za sev <i>C. coli</i> 72/P.....	46
Slika 26: Ugotavljanje minimalne inhibitorne koncentracije ekstrakta Ros.conh za sev <i>C. jejuni</i> 96/P.....	47
Slika 27: Ugotavljanje minimalne inhibitorne koncentracije ekstrakta Ros.conh za sev <i>C. coli</i> 100/P.....	47
Slika 28: Ugotavljanje minimalne inhibitorne koncentracije ekstrakta Ros.conh za sev <i>C. coli</i> 21/F.....	47
Slika 29: Ugotavljanje minimalne inhibitorne koncentracije ekstrakta Ros.conh za sev <i>C. coli</i> 9249.....	48
Slika 30: Ugotavljanje minimalne inhibitorne koncentracije ekstrakta Ros.conh za sev <i>C. jejuni</i> 28233/01.....	48

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

a_w	termodinamska aktivnost vode
BHI bujon	Brain Heart Infusion bujon
<i>C. coli</i>	<i>Campylobacter coli</i>
cfu	število kolonijskih enot (Colony Forming Units)
<i>C. jejuni</i>	<i>Campylobacter jejuni</i>
DNA	deoksiribonukleinska kislina
EI	Ros.con
EII	Ros.conh
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EtOH	etanol
G+	po Gramu pozitivne bakterije
G-	po Gramu negativne bakterije
GRAS	na splošno spoznano kot varno (Generally Recognized As Safe)
h	ura
IgA	imunoglobulin
LPS	lipopolisaharidni sloj v zunanji membrani po Gramu negativnih bakterij
MA	mikroaerofilna atmosfera (3 % kisika, 10 % ogljikovega dioksida, 87 % dušika)
MH gojišče	Mueller Hinton gojišče
MIC	minimalna inhibitorna koncentracija (Minimal Inhibitory Concentration)
NA	nalidiksična kislina (Nalidixic Acid)
PMF	protonski gradient na membrani (Proton Motive Force)
PgP	P-glikoproteini (membranski transportni proteini)
rRNA	ribosomalna ribonukleinska kislina

1 UVOD

Varna in kakovostna hrana je osnova zdrave prehrane. Pojem »varne hrane« vključuje kemijsko varnost in preprečevanje bolezni, povzročenih z zaužitjem mikrobiološko onesnažene hrane. Mikroorganizmi, njihovi encimi in drugi produkti metabolizma so namreč osnovni povzročitelji kvara živil in s tem povezanega skrajšanja obstojnosti. Proizvajalci za podaljšanje obstojnosti živil posegajo po kemijskih konzervansih, ki preprečujejo kemijsko in mikrobiološko kvarjenje oz. ga upočasnijo (Gošnjak, 2004). Zahteve na trgu pa se spreminjajo. Potrošniki želijo kakovostna in obstojna živila, ki ne vsebujejo kemijskih konzervansov in radikalnih postopkov konzerviranja (npr.: sterilizacija, pasterizacija...), tudi manj slana in sladkana živila. Alternativno nadomestilo za kemijske konzervanse so lahko naravni rastlinski ekstrakti, ki imajo poleg protimikrobnih tudi antioksidativne učinke (Gould, 2004). Pomembno je poudariti, da le nekateri rastlinski ekstrakti lahko izpolnijo zahteve glede izbora splošno uporabnega dodatka živilu. Imeti mora širok spekter protimikrobnega delovanja, primerne fizikalno kemijske lastnosti (topnost, hidrofilnost oz. hidrofobnost, obstojnost), učinkovitost v živilu, ki mora biti povsem varno za potrošnika, poleg tega ne sme spreminjati senzoričnih lastnosti živila ipd.

Protimikrobni učinki rastlinskih izvlečkov so znani že več stoletij, vendar pa so ekstrakti zaradi svojih močnih arom omejeni pri uporabi v hrani (Del Campo in sod., 2000). Rastlinske ekstrakte pridobivamo iz skorje, listov, cvetov, plodov in semen. Uporabljamo pa jih kot dodatek k hrani za izboljšavo vonja, okusa (Araujo in sod., 2003). Najbolj poznane začimbe in zelišča s protimikrobnim delovanjem so: čebula, česen, origano, rožmarin, koriander, cimet, nageljnova žbica, žajbelj in timijan (Burt, 2004; Lopez-Malo Vigil in sod., 2005). Med zelišči in začimbami je rožmarin ena redkih domačih rastlin, ki raste na različnih koncih sveta. Navadno se ga uporablja kot začimbo k hrani, v kozmetiki in tradicionalni medicini (Santoyo in sod., 2005).

Ekstrakti rožmarina vsebujejo fenolne spojine, le te pa so odgovorne za protimikrobno delovanje. Nekateri med njimi so: rožmarinska kislina, karnozol, karnozolna kislina, evgenol in ursolna kislina (Del Campo in sod., 2000). Raziskave so pokazale, da ekstrakt rožmarina učinkuje na po Gramu pozitivne ali negativne bakterije in kvasovke - vendar pa je protimikrobni učinek ekstrakta večji na gram pozitivne bakterije, kot na gram negativne bakterije (Santoyo in sod., 2005).

Campylobacter je po Gramu negativna, patogena bakterija, ki je razvila odpornost na določene antibiotike in druge protimikrobne snovi. Kampilobakterji so med vodilnimi povzročitelji črevesnih obolenj pri človeku, zaradi njihovih neobičajnih rastihtnih zahtev pa še ni mednarodno sprejetih kriterijev za ugotavljanje občutljivosti teh bakterij za različna protimikrobna sredstva. Uporabljajo se različne difuzijske in dilucijske metode.

V praktičnem delu diplomske naloge smo ugotavljali protimikrobno delovanje ekstraktov rožmarina na bakterije vrst *C. coli* in *C. jejuni* z različnimi metodami, ki predvidoma lahko vplivajo na dobljeni rezultat. Iskali smo tudi morebitno zvezo med učinkovitostjo ekstraktov rožmarina proti različnim izolatom in odpornostjo izolatov proti nekaterim antibiotikom. Pri tem smo uporabljali komercialna ekstrakta rožmarina (Ros.con in Ros.conh), ki sta vsebovala različni koncentraciji karnozolne kisline, za katero smo predvidevali, da ima ključni pomen pri inhibiciji rasti kampilobakterjev.

2 PREGLED OBJAV

2.1 RASTLINSKI EKSTRAKTI KOT NARAVNA PROTIMIKROBNA SREDSTVA

Naraščajoče zanimanje za nadomestke tradicionalnih konzervansov v hrani je pospešilo preučevanje rastlinskih izvlečkov, z namenom odkritja novih, naravnih aditivov za živilstvo. Že od nekdaj je znano, da imajo začimbe in druge aromatične rastline, predvsem njihova eterična olja in ekstrakti, močno protimikrobno delovanje. Uporabljajo se za inhibicijo rasti patogenih mikroorganizmov in mikrobnih povzročiteljev kvarjenja hrane. Večina eteričnih olj in ekstraktov je »na splošno spoznana kot varna« (GRAS-generally recognized as safe) sestavina (Santoyo in sod., 2004). Najbolj poznane in v živilstvu uporabljene rastline s protimikrobnim delovanjem so: origano, rožmarin, koriander, cimet, nageljnova žbica, čebula, česen, bazilika, timijan, žajbelj...

Pri izboru naravnega protimikrobnega sredstva je potrebno upoštevati več različnih dejavnikov: fizikalno-kemijske lastnosti živila oz. matriksa, kjer bo sredstvo uporabljeno, način obdelave živila in spekter delovanja protimikrobnega sredstva (ciljni mikroorganizem).

Polarnost protimikrobnega sredstva je ena od njegovih najpomembnejših fizikalno-kemijskih lastnosti. Polarnost omogoča topnost v vodi, mediju za razmnoževanje mikroorganizmov. Po drugi strani je priporočljivo, da ima protimikrobna snov lipofilne lastnosti, ker to omogoča dobro prehodnost skozi hidrofobno celično membrano. Lipofilna snov pa ne deluje v vodnem mediju (Branen in sod, 1980).

Protimikrobna sredstva lahko tvorijo kemijske reakcije z različnimi komponentami živila (lipidi, beljakovinami, ogljikovimi hidrati in drugimi hranilnimi dodatki), kar lahko zniža njihovo aktivnost. Pri tem lahko nastajajo nezaželen okus, vonj ali barva živila. Prav tako lahko delovanje ekstrakta oz. eteričnega olja zmanjša visoka temperatura obdelave živila (Davidson in Branen, 2005).

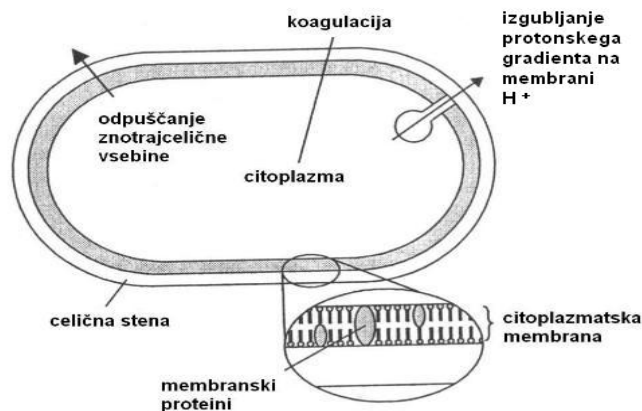
Protimikrobna sredstva delujejo na različne mikroorganizme (bakterije, kvasovke, glive) in njihove oblike (vegetativne celice, spore...). Učinek je odvisen od rodu in vrste bakterij. Primer so hidrofobne spojine, ki imajo omejen učinek na po Gramu negativne bakterije, saj lipopolisaharidna zunanja membrana omeji njihovo difuzijo v notranjost bakterije (Davidson in Branen, 2005).

2.1.1 Protimikrobne spojine v rastlinah

Rastline imajo skoraj neomejeno sposobnost sinteze aromatskih spojin, predvsem fenolnih spojin in njihovih derivatov, ki so najbolj odgovorne za protimikrobno delovanje rastlinskih ekstraktov. Fenolne spojine so spojine z najmanj enim aromatskim obročem in eno ali več (polifenoli) hidroksilnimi skupinami, vezanimi na aromatski obroč. V večini primerov so to sekundarni metaboliti, ki služijo kot obrambni mehanizmi rastline pred mikroorganizmi, insekti in rastlinojedci. So predvsem v zelenih delih rastline, koži, skorji in plodu (Araujo, 2003). Sestava protimikrobnih spojin neke določene rastline (npr. origano, rožmarin, timijan) pa se lahko razlikuje glede na čas žetve in geografsko poreklo (Burt, 2004). Rastlinske protimikrobne spojine lahko glede na kemijsko zgradbo delimo na več skupin, ki jih avtorji različno razdelijo. Cowan (1999) jih v svojem članku deli tako :

- fenoli in polifenoli (enostavni fenoli in fenolne kisline, kinoni, flavoni, flavonoidi in flavonoli, tanini, kumarini)
- terpenoidi in eterična olja
- alkaloidi
- lektini in polipeptidi.

Protimikrobna aktivnost neke snovi je odvisna od njene kemijske strukture in uporabljene količine (Lopez-Malo Vigil in sod., 2005). Fenolne komponente vplivajo na bakterijsko rast in njen metabolizem. Zaradi svoje hidrofobnosti lahko poškodujejo celično membrano, membranske proteine in pri tem povzročijo odpuščanje znotrajcelične vsebine, citoplazmatsko koagulacijo, izgubljanje protonskega gradienta na membrani (PMF), preprečijo transport elektronov in aktiven transport, kar lahko privede do celične smrti (Burt, 2004).



Slika 1: Posledice učinkovanja protimikrobnega rastlinskega izvlečka na bakterijsko celico (Burt, 2004)

2.1.1.1 Enostavni fenoli in fenolne kisline

Enostavni fenoli so spojine, ki so sestavljene iz enega benzenskega obroča, na katerega je vezana najmanj ena –OH skupina. Med seboj se razlikujejo glede na položaj hidroksilne skupine, vezane na aromatskem obroču, vendar pa to ne vpliva močno na stopnjo protimikrobne aktivnosti (Burt, 2004). Cowan (1999) navaja, da se s številom hidroksilnih skupin na fenolni spojini povečuje toksičnost za mikroorganizme, vendar pa stopnja hidroksilacije še ne pomeni, da lahko napovemo toksičnost nekega fenola, lahko jo samo predvidimo. Med najbolj pogoste predstavnike te skupine štejemo kavno kislino in njen ester, rožmarinsko kislino ter ferulno kislino.

2.1.1.2 Flavoni, flavonoidi in flavonoli

Flavonoidi so kemijsko 2-fenil benzopireni, z zgradbo 15 C-atomov in osnovno strukturo (C₆-C₃-C₆), ki se imenuje flavon. So polifenoli, saj imajo več –OH skupin, delimo pa jih v šest skupin: flavoni, flavanoni, flavonoli, flavanoli, izoflavoni in antocianini. Flavoni so fenolne spojine, ki vsebujejo eno karbonilno skupino, flavonol pa vsebuje še 3-hidroksilno skupino. Glede na to, da se flavonoidi sintetizirajo v rastlini kot odgovor na infekcije, ne preseneča dejstvo, da so po mnogih testiranjih *in vitro* pokazali sposobnost delovanja proti široki paleti mikroorganizmov. Njihova učinkovitost je odvisna predvsem od njihove sposobnosti tvorbe kompleksa z zunajceličnimi proteini in s celično steno ter inaktivacijo določenih encimov (Cowan, 1999).

2.1.1.3 Kinoni

Kinoni so sestavljeni iz fenolnih obročev in dveh keto skupin. Pridobljeni so z oksidacijo dihidroksi fenolov. So zelo reaktivne in v naravi povsod razširjene spojine. Odgovorni so za rjavenje narezanega sadja in zelenjave in so intermediati pri sintezi melanina v človeški koži. Reagirajo s proteini patogenih mikroorganizmov, tako da formirajo melanoidne polimere (Cowan, 1999; Shetty in Lin, 2006). Kinoni tvorijo ireverzibilne komplekse z aminokislinami in proteini, kar pogosto vodi v inaktivacijo proteinov in izgubo njihove funkcije. Najpogostejše tarče v mikrobnih celicah so adhezini na površini celice, polipeptidi v celični steni in membransko vezani encimi (Cowan, 1999).

2.1.1.4 Tanini

Tanini so polimerne fenolne spojine. Dobimo jih lahko s polimerizacijo kinonov. Imajo protimikrobno delovanje, kar potrjuje njihova sposobnost inaktivacije mikrobnih adhezinov, encimov in transportnih proteinov v celični steni. Tvorijo tudi komplekse s polisaharidi. Njihov protimikrobni učinek še ni povsem raziskan. V rastlini zavirajo rast in razmnoževanje insektov (Cowan, 1999).

2.1.1.5 Kumarini

Kumarini so fenolne substance, ki nastanejo z združitvijo benzena in α -pirolnega obroča. Odgovorni so za značilen vonj sena. Nekateri kumarini imajo tudi protimikrobni učinek. *In vitro* raziskave so pokazale, da inhibirajo rast gliv iz rodu *Candida*, pri bakterijah pa naj bi imeli večji učinek na po Gramu pozitivne bakterije. Znano je, da kumarini stimulirajo makrofage, ki lahko negativno učinkujejo na infekcije (Cowan, 1999).

2.1.1.6 Terpenoidi in eterična olja

Eterična olja so sekundarni metaboliti rastline in so tudi obogatena s sestavinami, ki bazirajo na spojinah z izoprensko strukturo. Imenujemo jih terpeni, njihova osnovna kemijska struktura je C₁₀H₁₆. Pojavljajo se kot diterpeni, triterpeni in tetraterpeni (C₂₀, C₃₀ in C₄₀). Terpeni, ki vsebujejo še nekatere dodatne kemijske elemente, najpogosteje kisik, imenujejo terpenoidi. Terpeni in terpenoidi imajo protimikrobno delovanje. V letu 1977 je

bilo prvič objavljeno, da je kar 60 % testiranih rastlinskih eteričnih olj inhibitorno delovalo na glive, medtem ko jih je 30 % zavrlo rast bakterij. Mehanizem delovanja eteričnih olj še ni

povsem pojasnen, vendar domnevajo, da so v membranski razkroj vključene lipidne komponente. Terpenoidi so sintetizirani iz acetatnih enot in kot taki imajo lastnosti maščobnih kislin (Cowan, 1999).

Fenolne komponente so najbolj odgovorne za protimikrobno delovanje eteričnih olj. Najbolj poznane komponente eteričnih olj so: timol, evgenol, karvakrol, kamfor, borneol, cineol in drugi. Imajo protimikrobne lastnosti ob vzajemnem učinkovanju drugih sestavin eteričnih olj (Burt, 2004).

2.1.2 Rožmarin

Rožmarin (*Rosmarinus officinalis* L.) je rastlina, ki izvira s sredozemskih gričev, predvsem Portugalske in jugozahodne Španije. Zanimiv je izvor imena. Latinsko *ros maris* pomeni »morska solza«. Tako se imenuje zaradi solzam podobne oblike kapljic, ki jih na rastline ob morju razprši veter. Je vedno zeleni grmiček, ki spomladi zacveti v toplejših predelih Evrope, v različnih odtenkih vijolične, modre ali celo bele barve. Raste pri temperaturi 9 do 28 °C in pH prsti med 4,5 in 8,7. Je rastlina, ki ne potrebuje veliko vode, zato je podlaga predvsem kamenita ali peščena, prst pa se mora nahajati vsaj 0,2 m pod površino, iz katere črpa potrebne hranilne snovi (Wren, 1988). Zaradi izjemne arome se njegova zelišča in olja najpogosteje uporabljajo kot začimbe v kulinariki in živilski predelovalni industriji. Zaradi antiseptičnega delovanja pa so ga še nedavno v mnogih bolnišnicah uporabljali za čiščenje zraka. Ugotovili so, da imajo rožmarinski ekstrakti tudi pomembno protitumorsko funkcijo. Povečujejo učinkovitost protitumorskih zdravil, tako da inhibirajo membranske transportne proteine oziroma črpalke v membrani tumorskih celic (Plouzek in sod., 1999).

2.1.2.1 Protimikrobno delovanje rožmarina in njegovih sestavin

Rožmarin je v zadnjem obdobju zanimiv predvsem zaradi svojega antioksidativnega in protimikrobnega delovanja. Najbolj pomembne sestavine rožmarinskih ekstraktov so razdeljene v pet večjih skupin (Wren, 1988; Araujo in sod., 2003; Del Bano in sod., 2003; Angioni in sod., 2004; Almela in sod., 2006):

- eterična olja: borneol, cineol, linalol, kamfor, α - in β -pinen, verbenon, evgenol
- flavonoidi: apigenin, rutin, diosmin, genkvanin, luteolin in derivati
- fenolne kisline: rožmarinska kislina, ferulna in kavna kislina
- diterpeni: karnozol, karnozolna kislina, rožmanol, epirožmanol, betulin, betulinska kislina, rožmakinon A in B, roficeron
- triterpeni: ursolna kislina, hidroksibetulinska kislina, 12-O-metilkarnozolna kislina

Zeleni deli rožmarina vsebujejo približno od 1 do 25 % eteričnega olja, ki ga v večjem delu sestavljajo: 1,8-cineol (30 %), kamfor (15-25 %), borneol (16-20 %), bornil acetat (max 7 %), α -pinen. Eterična olja ekstrahirajo z metodo parne destilacije ali s pomočjo organskih topil iz cvetov, zelenih delov in debelca (Wren, 1988). So hlapne sestavine, odgovorne za aromo.

Preglednica 1: Prevladujoče hlapne in nehlapne komponente v ekstraktih različnih rastlin družine ustnatic (Lamiceae) (Petauer, 1993; Cowan, 1999; Araujo in sod., 2003; Burt, 2004; Hadolin, 2004; Lopez-Malo Vigil in sod., 2005)

Rastlina (lat. ime)	Hlapne komponente	Nehlapne komponente
Origano (<i>Origanum vulgare</i>)	0,15-1 % eteričnega olja: timol, karvakrol, α -pinen	8 % čreslovin, grenke snovi, smola, vitamin C
Rožmarin (<i>Rosmarinus officinalis</i>)	1,2-2 % eteričnega olja: borneol, cineol, kamfor, bornil acetat, α -pinen	8 % čreslovin, grenke snovi, saponin, smola, organske kisline
Žajbelj (<i>Salvia officinalis</i>)	1-2,5 % eteričnega olja: cineol, borneol, timol, evgenol	5-10 % čreslovin, 5 % smole, guma, asparagin, saponin, flavonoidi
Timijan (<i>Thymus vulgaris</i>)	0,3-2,5 % eteričnega olja: timol, karvakrol, linalol	10 % čreslovin, grenke snovi, saponini, organske kisline, smole, pentozan
Melisa (<i>Melissa officinalis</i>)	0,01-0,1 % eteričnega olja: linalol, heksenal, heksil acetat	4-5 % čreslovine, grenke snovi, smola, jantarna kislina, rudninske snovi
Sivka (<i>Lavandula angustifolia</i>)	do 5 % eteričnega olja: α in β -pinen, kamfor, heksil acetat, linalol, borneol	10 % čreslovin, grenke snovi, saponini, smola
Poprova meta (<i>Mentha piperita</i>)	1-4 % eteričnega olja: α in β -pinen, mentol, menton, linalol, bornil acetat	6-12 % čreslovin, grenke snovi, hesperidin, encimi, provitamin A
Bazilika (<i>Ocimum basilicum</i>)	do 0,9 % eteričnega olja: linalol, evgenol, geraniol, cineol, anetol	5 % čreslovin, saponini, glikozidi
Šetraj (<i>Satureia hortensis</i>)	0,8-2 % eteričnega olja: cineol, karvakrol, α in β -pinen, fenoli	4,85-8,65 % čreslovin, sluz, smola
Korijander (<i>Coriandrum sativum</i>)	0,2-2,6 % eteričnega olja: koriandor, α in β -pinen, linalol	čreslovine, 16-18 % beljakovin, sluz
Lovor (<i>Laurus nobilis</i>)	0,3-3,1 % eteričnega olja: cineol, α in β -pinen, evgenol, borneol, geraniol	veliko čreslovin, saponini

Za protimikrobno delovanje rožmarina so najbolj odgovorne fenolne spojine. Cuvelier in sod. (1996) so na podlagi raziskav 24 različnih rožmarinovitih ekstraktov razvrstili fenole v tri skupine, glede na polarnost: fenolne kisline (kavna kislina, rožmarinska kislina), flavonoide (apigenin, rutin) in fenolne diterpene. V slednjo skupino spadata karnozolna kislina in karnozol, za katera se predvideva, da imata največji protimikrobni učinek (Del Campo in sod., 2000). V zadnjem obdobju pa se s protimikrobnim učinkom omenja

tudi rožmarinska kislina kot vodotopna sestavina ekstraktov rožmarina, vendar je protimikrobna učinkovitost slabša, spekter delovanja pa ožji (Moreno in sod., 2006).

Način ekstrakcije je odvisen od same rastline in njenih komponent, ki jih želimo ekstrahirati. Ekstrakte rožmarina najpogosteje pridobivajo z organsko in superkrično tekočinsko ekstrakcijo (Albu in sod., 2004).

Pri organski ekstrakciji se eterična olja iz zelenih predelov rožmarina odstranijo s pomočjo destilacije s paro, vodo, metanolom ali pa z organskimi topili (Del Campo in sod., 2000). Pri superkrični tekočinski ekstrakciji pa se za frakcioniranje uporablja ogljikov dioksid. Je najboljše topilo, ker je naraven, ni toksičen in ni eksploziven, zelo lahko pa se odstranjuje iz ekstrahiranih produktov. Rezultati plinske kromatografije z masno spektroskopijo so pokazali, da je superkrična tekočinska ekstrakcija z ogljikovim dioksidom zelo učinkovita, ekstrakti, pridobljeni na tak način, pa so bolj kvalitetni od ekstraktov, pridobljenih z organsko ekstrakcijo ali vodno in parno destilacijo. Pri slednjih lahko pride do razkroja zaradi visokih temperatur ali ostankov toksičnega topila (Santoyo in sod., 2004; Carvalho in sod., 2005; Diaz-Reinoso in sod., 2006).

Preglednica 2: Količina rožmarinske kisline, karnozolne kisline in karnozola v ekstraktih rožmarina, pridobljenih z različnimi topili (Moreno in sod., 2006)

ekstrakti topilo	količina (g/100 g ekstrakta)		
	rožmarinska kislina	karnozolna kislina	karnozol
acetone	4,0	21,5	11,0
metanol	5,5	30,5	16,2
voda	14,5	/	/

Ekstrakt, pridobljen z metanolno ekstrakcijo, vsebuje 30 % karnozolne kisline, 16 % karnozola in 5 % rožmarinove kisline. Kot tak ima največji protimikrobni učinek na po Gramu pozitivne bakterije ali negativne bakterije in kvasovke. Tudi ekstrakcija z acetonom zagotavlja visok delež karnozolne kisline in karnozola v dobljenem ekstraktu. Vodni ekstrakt pa vsebuje le 15 % rožmarinove kisline in ima ozek spekter protimikrobnega delovanja (Moreno in sod., 2006).

Način ekstrakcije je odločilni dejavnik pri kasnejši protimikrobni učinkovitosti ekstrakta. Zaradi tega je neposredna primerjava učinkovitosti posameznih rastlinskih ekstraktov, ki so bili pripravljani v različnih raziskavah, zelo težavna ali celo nemogoča (Nostro in sod., 2000).

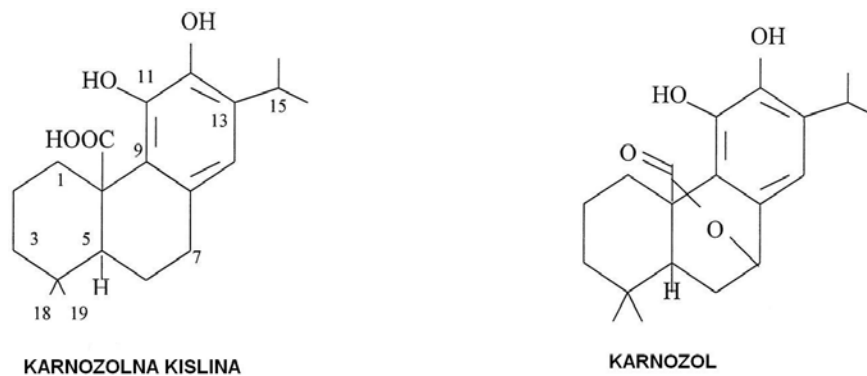
2.1.2.2 Karnozolna kislina in karnozol

Karnozolna kislina ($M=332$ g/mol) je najbolj razširjen diterpen (Munne-Bosch in Alegre, 2001). Pri sobni temperaturi je kristalinična sol, točko tališča ima pri 189-192 °C. Vsebnost karnozolne kisline v posušenih rožmarinovitih listih je med 2 in 3 %. Topna je v metanolu, etanolu in acetonu in deloma tudi v vodi. Največji protimikrobni učinek ima na bakterije in kvasovke (Del Campo in sod., 2000). Karnozol je lakton karnozolne kisline. Zaradi tega imata podobno delovanje, vendar pa ima karnozol, kot samostojna komponenta, manjši protimikrobni učinek.

Karnozol je diterpen. Diterpeni spadajo v skupino terpenov, katerih, ki se v rastlinah se pojavljajo skupaj s triterpeni in tetraterpeni. Diterpeni so v celici locirani v kloroplastu, endoplazmatskem retikulumu, Golgijevem aparatu in plazmalemi. V rastlini prevzemajo različne vloge. Lahko se obnašajo kot hormoni (giberelini), regulatorji odgovorov na

poškodbe (grenčične kisline), fotosintetski pigmenti, antioksidanti in kot protimikrobno delujoče sestavine (Munne-Bosch in Alegre, 2001).

Del Bano in sod. (2006) ter Moreno in sod. (2006) navajajo, da na količino karnozolne kisline v rastlini vplivajo tako genetski dejavniki, faza rasti oz. zrelost rastline, kot tudi okoljski (geografski) pogoji. V rožmarinu iz mediteranskega klimatskega območja je glavni fenolni diterpen karnozolna kislina in jo vsebuje okoli 6 %, argentinski rožmarin pa vsebuje tudi do 30 % karnozolne kisline. V ekstraktu finskega rožmarina pa je bila prevladujoča fenolna komponenta rožmarinska kislina (Dorman in sod., 2003).



Slika 2: Strukturna formula karnozolne kisline in karnozola (Munne-Bosch in Alegre, 2001).

Karnozolna kislina in karnozol imata poleg protimikrobnega učinka še druge pomembne farmakološke lastnosti. Delujeta tudi antioksidativno, antikancerogeno in antimutageno ščitita pred kromosomskimi poškodbami, ki jih povzročajo γ -žarki in to pred in po izpostavitvi sevanju. Učinek je odvisen od strukture, verjetno pa so vključeni različni zaščitni mehanizmi (Del Bano in sod., 2006). Največ se uporabljata kot antioksidanta, saj imata sposobnost vezave prostih radikalov (Liang in sod., 2002).

Karnozolna kislina je v literaturi opisana tudi kot inhibitor lipazne aktivnosti in s tem absorpcije maščob, kar je ključnega pomena v shujševalnih dietah (Ninomiya in sod., 2004), kot promotor sinteze rastnega faktorja živčnih celic, kar je pomembno pri terapiji Alzheimerjeve bolezni in drugih oblik demence (Kosaka in Yokoi, 2003). Karnozolna kislina pospešuje tudi protikancerogeno delovanje vitamina D₃ in njegovih analogov in inhibira rast nekaterih drugih vrst tumorskih celic (Del Bano in sod., 2006).

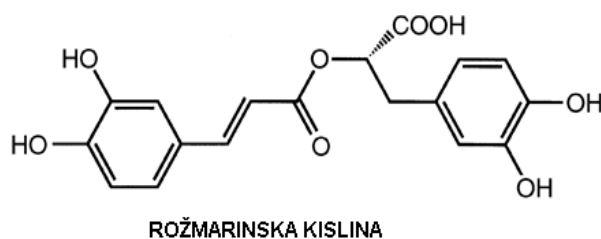
Rožmarinski ekstrakti so opisani tudi kot učinkovita sredstva, ki pospešujejo akumulacijo kemoterapevtikov v tumorskih celicah zaradi inhibitornega delovanja na membranske transportne proteine (PgP), ki sicer izčrpavajo zdravila iz celic in prispevajo k večji kemoterapevtski odpornosti tumorskih celic (Plouzek in sod., 1999).

2.1.2.3 Rožmarinska kislina

Rožmarinsko kislino ($M = 360$ g/mol) sta kot samostojno komponento iz rožmarina prva izolirala Italijana Scarpati in Oriente (Petersen in Simmonds, 2003). Pri temperaturi 25 °C je kristalinična sol, točko tališča ima pri 171-175 °C. Najbolj pogosto jo najdemo v rastlinah iz

družine ustnatic (Lamiaceae) (Shetty, 2006). Rožmarinska kislina je ester kavne in mlečne kisline. Zgrajena je iz dveh fenolnih obročev, med katerima sta karbonilna in karboksilna skupina. Vsak obroč pa vsebuje tudi –OH skupino (Tepe in sod., 2006). Je tipična fenolna kislina in je poleg karnozolne kisline in karnozola najbolj odgovorna za protimikrobno delovanje rožmarinovega ekstrakta (Moreno in sod., 2006). Vpliva na izgubljanje protonskega gradienta na membrani bakterijske celice, kar vodi do pomankanja energije in posledično do celične smrti (Shetty in Lin, 2006).

Rožmarinska kislina je vodotopna sestavina in jo pridobivamo z vodno ekstrakcijo. Čista komponenta ima dober protimikrobni učinek na po Gramu pozitivne bakterije, kjer je določena minimalna inhibitorna koncentracija 16-60 µg/ml. Na po Gramu negativne bakterije kot čista komponenta nima protimikrobnega učinka in je verjetno aktivna le v prisotnosti karnozolne kisline (Petersen, 2003; Moreno in sod., 2006).



Slika 3: Strukturna formula rožmarinske kisline (Makino in sod., 2000)

2.2 BAKTERIJE *Campylobacter*

2.2.1 Taksonomska razvrstitev ter ekološke in genetske značilnosti

Rod *Campylobacter* spada v družino Campylobacteraceae. Taksonomija rodu *Campylobacter* se skozi čas spreminja predvsem zaradi naraščajočega zanimanja zanj in zaradi izpopolnjenih metod, ki se uporabljajo v taksonomske namene. Rod vsebuje 14 vrst in 6 podvrst. Nekatere vrste, ki so prej pripadale temu rodu ali pa so veljale za kampilobakterjem podobne, so sedaj uvrščene v druge rodove, ki so mu filogenetsko podobni, kot npr. *Arcobacter* in *Helicobacter* (Snelling in sod., 2004; The genus *Campylobacter*, 2001).

Kampilobakterji so po Gramu negativne, spiralno zvite, paličaste bakterije (grško: »campylo«: ukrivljen), ki so nesporogene. Bakterije so dolge od 0,5 do 5 µm in široke od 0,2 do 0,8 µm. Glede na različna mikrobiološka gojišča lahko kampilobakterji tvorijo tudi različne kolonije: sive, ploščate, nepravilne kolonije, ki so lahko okrogle, izbočene in lesketajoče (Snelling in sod., 2005; Butzler, 2004).

Bakterije rodu *Campylobacter* rastejo in se razmnožujejo v mikroaerofilnih pogojih, z majhno koncentracijo kisika (5 %), 10 % ogljikovega dioksida in do 85 % dušika. So termotolerantne bakterije, katerih optimalna temperatura za rast je 42 °C. V laboratorijih pa rastejo na specifičnih mikrobioloških gojiščih, ob dodatku 5 % ovčje ali konjske krvi. Optimalen pH za rast *C. jejuni* je med 4,9 in 9,5, ugodno temperaturno območje med 30 in 45 °C, minimalna a_w pa 0,987. Kampilobakterji ne rastejo v območju, kjer je koncentracija NaCl nad 1,5 % (Potential food safety hazard, 2003). Biokemijski testi, ki razlikujejo *C. jejuni* od ostalih vrst,

so pokazali, da ima *C. jejuni* katalazo in oksidazo, ne raste pri koncentraciji NaCl 3,5 %, reducira nitrate, hidrolizira hipurat in ne fermentira sladkorjev.

Kampilobakterji imajo respiratorni tip metabolizma, ki temelji na Krebsovem ciklusu. Kisik, kot končni akceptor elektronov, je torej pomemben za rast in delovanje bakterije, vendar le v količini do 10 %. Atmosferski kisik je za bakterije rodu *Campylobacter* toksičen (Skirrow, 2003). Organizem *C. jejuni* za svojo rast in energijo uporablja aminokislino in intermediate Krebsovega cikla, ker je sposoben reducirati fumarat do sukcinata (Smole Možina in Uzunović Kamberović, 2005; Snelling in sod., 2004; Moore in sod., 2006).

Bakterije vrst *C. coli* so manj pogosti povzročitelji bolezni pri človeku kot *C. jejuni*. Čeprav so biokemijsko zelo podobni *C. jejuni*, jih najpogostje loči test hidrolize hipurata; *C. coli* so na test negativni.

Campylobacter jejuni vsebuje približno 50 termotolerantnih antigenov K in H (pomembni pri izločanju toksinov) ter 60 različnih termostabilnih antigenov O (Campylobacter, 2006). Glavni antigen je lipopolisaharid zunanje membrane, takoimenovani O-antigen in se uporablja kot lastnost bakterije za dokazovanje pri seroloških testih (Andlovic, 2002).



Slika 4: *Campylobacter* (the *Campylobacter* information site, 2000)

2.2.2 Epidemiologija in patogeneza kampilobakterioz

Kampilobakterji živijo kot komenzali v črevesni mikroflori, sečilih in prebavilih piščancev, prašičev, goveda in nekaterih divjih živali (Luber in sod., 2003). *C. jejuni* najdemo v črevesju številnih živalskih vrst, medtem ko je *C. coli* razširjen predvsem med prašiči (Andlovic, 2002).

Bolezen, ki jo povzročajo bakterije rodu *Campylobacter*, se imenuje kampilobakterioza in jo uvrščamo med zoonoze. Najpogostejši vzrok okužbe je uživanje okuženega mesa, neprekuhanega kontaminiranega mleka ali vode, svežega sadja in zelenjave, kakor tudi neposredni stik z živalmi (Butzler, 2004; Smole Možina in Kamberović Uzunović, 2005). Možen je tudi neposredni prenos med ljudmi. Študije so pokazale, da nepravilno postopanje in način porabe perutnine predstavlja največje tveganje za okužbo s kampilobakterji v današnjem času (Effler in sod., 2001; Andlovic, 2002). Piščančje meso s kožo je kontaminirano bolj kot meso brez kože, saj gre za površinsko kontaminacijo s črevesno vsebino, predvsem med zakolom (Skirrow, 2003).

Okužbe s kampilobakterji, predvsem *C. jejuni* in *C. coli*, so med najbolj razširjenimi v svetu (Nachamkin in sod., 1995). V manj razvitih državah zbolevalo prevsem otroci do 2 let, v razvitih pa mladi in odrasli (18 do 45 let). V bolj razvitih državah povzročajo vrste *C. jejuni* kar 95 % vseh okužb s kampilobakterji, medtem ko *C. coli* le 3-4 %. Največ obolenj je v poletnih mesecih, ker so glavni pozročitelji boleznih *C. jejuni* in *C. coli*, termofilne bakterije. V Sloveniji so kampilobakterji na drugem mestu za salmonelami med bakterijskimi povzročitelji driske (Andlovic, 2002).

Relativno zelo majhno število bakterij, približno 800, že lahko povzroči bolezen pri zdravemu človeku. Inkubacija kampilobakterjev v človeškem organizmu traja približno 2-4 dni, nato nastopi bolezen. Čeprav bolezen redko traja več kot nekaj dni, se lahko v določenih primerih razvijejo težje oblike. Zapleti so redki in se pojavljajo kot zunajčrevesna vnetja, npr.: meningitis, sepsa in reaktivni artritis (Andlovic, 2002).

Črevesne okužbe povzročajo le gibljivi sevi, ki so se sposobni pritrditi na črevesno sluznico. Kampilobakterji so invazivne bakterije, ki izločajo toksine. *C. jejuni* izloča toplotno občutljiv enterotoksin (enterotoksin povzroča diarejo) in citotoksin (protein, ki uniči tarčno celico). Okužbe prebavil s *C. jejuni* potekajo kot vodena driska, v hujši obliki kot krvava driska (Andlovic, 2002). Krvava driska nakazuje na to, da je kampilobakter invazivna bakterija, ki se prebije skozi oblogo črevesa. V črevu izloča toksine in pri tem uničuje sluznico (*Campylobacter*, 2006).

2.3 RAZVOJ BAKTERIJSKE ODPORNOSTI

Odpornost je definirana kot začasna ali trajna sposobnost mikroorganizma in njegovih potomcev, da ohrani živost in se razmnožuje pod pogoji, ki bi uničili oz. ustavili razvoj ostalih mikroorganizmov (Cloete, 2003). Merilo odpornosti mikroorganizmov proti protimikrobnim sredstvom je minimalna inhibitorna koncentracija (MIC).

Definicije minimalne inhibitorne koncentracije se med različnimi avtorji nekoliko razlikujejo, vendar pa imajo vse enak zaključek, da je to najmanjša koncentracija protimikrobnega sredstva, ki je dosegla inhibicijo rasti mikroorganizmov (Avrain in sod., 2003). Vrednost MIC po Carsonu in sod. (1995) je najmanjša koncentracija, ki zniža preživelost celic v inokulumu. Vrednost MIC po Canillacu in Moureyu (2001) pa je najmanjša koncentracija protimikrobnega agensa, ki inhibira vse testirane organizme po 48 urni inkubaciji. Vrednost MIC po Delaquisu in sod. (2002) je najmanjša koncentracija, ki inhibira vidno rast testnega mikroorganizma.

Določanje vrednosti MIC je uporabno za vrednotenje relativne stopnje občutljivosti bakterij proti različnim protimikrobnim snovem in za primerjanje relativnih aktivnosti agensov proti različnim vrstam mikroorganizmov (Burt, 2004). Tako lahko glede na vrednost MIC določimo učinkovitost protimikrobnega sredstva. Če se pojavlja sprememba v občutljivosti mikroorganizma do določenega protimikrobnega sredstva, to pomeni, da je organizem razvil odpornost, saj ga začne zavračati in se nanj več ne odziva. Tarče delovanja protimikrobnih sredstev so ponavadi celična stena, proteini v membrani, sinteza folne kisline, metabolizem nukleinskih kislin, genetski material, encimi...(Gilbert in McBain, 2003). Raziskave so pokazale, da so vrednosti MIC za različne mikroorganizme v bujonu nekoliko nižje kot na agarju (Burt, 2004).

Izpostavljenost bakterij protimikrobnim sredstvom predstavlja selektivni pritisk na te bakterije. Mikroorganizmi so razvili mehanizme, da so se izognili inhibitornim učinkom protimikrobnih substanc (Schwarz in Chaslus-Dancla, 2001). V zadnjih letih so bakterije razvile odpornost proti sintetičnim substancam, kar je povzročila predvsem množična uporaba antibiotikov v veterinarski in humani medicini (Seme, 2002).

Bakterijska odpornost je lahko naravna ali pridobljena. O naravni odpornosti proti antibiotikom, ki jo imenujemo tudi prirojena ali intrinzična, govorimo, kadar je vsa bakterijska vrsta odporna proti neki skupini antibiotikov (Seme, 2002). Nastala je že v predantibiotski dobi zaradi genetskih, strukturnih in fizioloških lastnosti mikroorganizmov (Berce in sod., 2004). Posamezne bakterijske vrste ali rodovi so naravno odporni, kadar nimajo tarčnih mest, na katere antibiotiki delujejo. Nekatere vrste bakterij z značilno sestavo celične stene (po Gramu negativna celična stena bakterij) preprečujejo antibiotikom prodor do tarčnega mesta (Seme, 2002).

Pridobljena odpornost je rezultat spremenjene celične fiziologije in strukture in je nastala zaradi genetskih sprememb mikroorganizma. Značilna je samo za posamezne seve neke bakterijske vrste ali rodu (Seme, 2002; Berce in sod., 2004). Lahko je posledica mutacije kromosomskega ali plazmidnega gena posamezne bakterijske celice ali pridobitve nove genetske informacije z genskim prenosom iz druge bakterije, predvsem s konjugacijo ali transformacijo (Quintiliani in sod., 1999; Walsh, 2000; Seme, 2002; Sefton, 2002; Cloete, 2003).

2.3.1 Mehanizmi bakterijske odpornosti proti antibiotikom in drugim protimikrobnim snovem

Poznamo pet osnovnih mehanizmov bakterijske odpornosti proti antibiotikom (Seme, 2002):

- sprememba tarčnega mesta oz. oprijemališča antibiotika
- encimska razgradnja antibiotika
- neprepustnost oz. zmanjšana prepustnost celične membrane za antibiotik
- sprememba presnovne poti na katero deluje antibiotik
- aktivno izčrpavanje antibiotika iz bakterijske celice z neke vrste aktivnim transportom

Ti mehanizmi so najbolj preučeni pri antibiotikih, delujejo pa tudi pri delovanju drugih protimikrobnih snoveh, vključno z rastlinskimi izvlečki.

2.3.2 Odpornost bakterij iz rodu *Campylobacter* proti kemijskim protimikrobnim snovem

C. coli in *C. jejuni* sta pri človeku najpogostejši vzrok bakterijsko povzročenih enteritisov. V primerih zdravljenja obolenja zdravniki največkrat predpišejo makrolid eritromicin ali fluorokinolon ciprofloksacin (Payot in sod., 2004). Pred uvedbo kinolonov v veterinarsko prakso je bila odpornost *Campylobacter* spp. proti kinolonom nepoznana. Čeprav so se že pred tem v humani medicini uporabljali makrolidi, pojava odpornih sevov niso opazili. Po uvedbi in uporabi fluorokinolonov pri živalih pa je v mnogih državah prišlo do porasta odpornosti izoliranih *Campylobacter* spp. (Engberg in sod., 2002; Aarestrup in Engberg, 2001; Payot in sod., 2004).

Leta 1999 so osamili največ odpornih sevov *C. jejuni* in *C. coli* proti kinolonom iz humanih kliničnih vzorcev v naslednjih državah: Tajska 84 %, Španija 70 %, Avstrija 38 %, Italija 35 %, Finska 30 %, Francija 25 %, Nizozemska 22 %, Danska 21 %, ZDA 18%, Velika Britanija 14 %. V vseh državah so opazovali naraščanje odpornosti izoliranih kampilobakterjev med leti 1989 in 1999. Za *C. coli* je značilno, da so bili mnogo bolj odporni kot *C. jejuni*. Uporabo fluorokinolonov za profilaktične namene so v Kanadi prepovedali že leta 1997, v nekaterih evropskih deželah pa po uvedbi omejitve uporabe antibiotikov v veterini leta 1999 (Engberg in sod., 2002).

Delovanje kinolonov temelji na oblikovanju njihovega kompleksa z DNA in DNA-girazo (kinolon-giraza-DNA kompleks) ali topoizomerazo IV (kinolon-topoizomeraza IV-DNA). Ko se kinoloni vežejo v kompleks, povzročijo strukturno spremembo encima. Predvidevajo, da oblikovanje enega od obeh kompleksov reverzibilno zavira podvojevanje DNA in celično rast, kar pomeni, da je odgovorno za bakteriostatično delovanje kinolonov (Hawkey, 2003). Številne študije so pokazale, da so primarni vzrok odpornosti kampilobakterjev proti fluorokinolonom mutacije v genu, ki preprečijo nastanek stabilnega kompleksa med kinolonom, bakterijsko DNA in encimom girazo. To ima za posledico odpornost kampilobakterjev proti tem antibiotikom (Hakanen in sod., 2002; Walsh, 2000; Oyarzabal, 2005). Mehanizem odpornosti pri kampilobakterjih je povezan tudi s t.i. izlivnimi črpalkami, ki iz bakterijske celice z aktivnim izčrpavanjem izločajo protimikrobne snovi v okolje (Pidcock, 2003).

Zelo problematičen in neželen pa je pojav večkratno odpornih *Campylobacter* spp., predvsem odpornih hkrati na makrolide in kinolone (Engberg in sod., 2002). Kurinčič in sod. (2005) so naredili raziskavo o odpornosti različnih sevov, izoliranih iz piščančjega mesa, na osem

različnih antibiotikov. Prišli so do ugotovitve, da je bilo kar 61,8 % sevov odpornih na vsaj en antibiotik, 38,2 % sevov pa je bilo večkratno odpornih. Zaskrbljujoč podatek raziskave je, da je bilo kar 38,5 % sevov *C. jejuni* in 75,9 % sevov *C. coli* odpornih proti antibiotiku ciprofloksacin, ki se uporablja za zdravljenje kampilobakterioz pri pacientih.

Sevi, ki so jih Kurinčič in sod. (2005) uporabili za svojo raziskavo, smo uporabili tudi v tej nalogi. Skušali smo poiskati povezavo med odpornostjo na antibiotike in rastlinske ekstrakte oz. ugotoviti ali so sevi, odporni na eritromicin in ciprofloksacin pogosteje odporni tudi na rastlinske izvlečke.

Bakterije *Campylobacter* spp. so po Gramu negativne bakterije in zaradi tega manj občutljive za protimikrobna sredstva. Različne študije delovanja naravnih ekstraktov in eteričnih olj na bakterije *Campylobacter* spp. so pokazale, da so kampilobakterji v primerjavi z drugimi bakterijami na splošno dokaj odporni. Najbolj pogost in raziskan razlog je v zgradbi celične stene Gram negativnih bakterij, ki je za rastlinske izvlečke manj prepustna in zato težje prehajajo v celico (Friedman in sod., 2002; Herpaz in sod., 2003).

Silva in sod. (1997), ki so raziskovali protimikrobno učinkovitost ekstrakta rastlinske korenine *Terminalia macroptera* proti bakterijam *Escherichia coli*, *Salmonella* spp., *Campylobacter* spp. in *Shigella* spp. so ugotovili, da ima značilen protimikrobni učinek na *Campylobacter* spp. Minimalna inhibitorna koncentracija ekstrakta za bakterije *Campylobacter* spp. je bila med 25 in 50 µg/ml, medtem ko je bila za druge bakterije tudi do 10 mg/ml (npr. *Pseudomonas aureginosa*).

Lee in sod. (2004) so preučevali vpliv delovanja ekstraktov lukov (*Allium sativum* L., *Allium fistulosum*, *Allium odorum* L.) in česna na bakterije *C. jejuni* in *C. coli*, izolirane iz piščanca in ugotovili, da je bilo za inhibicijo rasti bakterij potrebno od 2,0 mg/ml do 5,0 mg/ml ekstrakta, enako za vse testirane seve. Minimalna inhibitorna koncentracija ekstrakta česna pa je bila med 4 in 5 mg/ml in je bila odvisna od posameznega seva.

Wannisorn in sod. (2005) so raziskovali učinke rastlinskih eteričnih olj na bakterije *Salmonella* spp., *Escherichia coli* in *Campylobacter jejuni* z difuzijsko metodo z diski. Ugotovili so, da je na bakterijo *Campylobacter* najbolj inhibitorno delovalo eterično olje mente in bazilike. Vendar so imeli tudi izvlečki cimeta, citrusa in evgenije inhibitoren učinek.

Podatkov o učinku rastlinskih ekstraktov na bakterije *Campylobacter* je v literaturi zelo malo, zato je tudi učinek rožmarinskega ekstrakta težko primerljiv z ostalimi.

2.3.3 Mehanizem odpornosti bakterij rodu *Campylobacter* proti protimikrobnim snovem

Odpornost bakterij *Campylobacter* je odvisna tudi od t.i. izlivnih črpalk. Mehanizem delovanja izlivnih črpalk vključuje izločanje strukturno različnih protimikrobnih snovi iz celice. Črpalke so protonski (H^+) antiporterji, ki komponente iz citoplazme premikajo proti protonsko koncentracijskemu gradientu (Van Bambeke in sod., 2000). Raziskave so pokazale, da so izlivne črpalke del obrambnega mehanizma nekega mikroorganizma proti naravnim toksinom. Čeprav se G- bakterije proti veliki količini hidrofilnih toksinov branijo z uporabo ozkih porinskih kanalov v zunanji membrani, pa lipidne komponente dopuščajo počasno difuzijo lipofilnih snovi (Gilbert in sod., 2003).

Izlivni transporterji so veliki in imajo primarno strukturo sestavljeno iz približno 1000 aminokislinskih ostankov, sekundarna struktura pa je vijačnica. Pri G- bakterijah so izlivne črpalke tridelni proteinski sistem (transporter notranje membrane, periplazmatski proteini, protein zunanje membrane), ki je povezan s proteinskim kanalom zunanje membrane in dopušča izrivanje substratov iz celice, skozi periplazmatski prostor v zunanji medij (Pumbwe in Piddock, 2002).

Obstaja več vrst izlivnih črpalk, vendar je pri bakterijah *Campylobacter* najpomembnejši in najbolj izpostavljen sistem CmeABC, ki ga sestavljajo trije deli: CmeA, CmeB in CmeC. Študije Lina in sod. (2002), so pokazale, da so črpalke CmeABC najbolj pogoste pri *C. jejuni*. Olah in sod. (2006), ki so ugotavljali prisotnost črpalk CmeABC pri bakterijah *C. jejuni* in *C. coli*, so ugotovili, da je bilo pri 51 % vseh izolatov možno potrditi prisotnost sistema CmeABC, od tega 85,5 % pri bakterijah *C. jejuni* in le 14,5 % pri bakterijah *C. coli*. Ugotavljajo pa tudi, da črpalke niso edini dejavnik odpornosti kampilobakterjev, temveč le eden od njih.

2.4 METODE UGOTAVLJANJA PROTIMIKROBNE UČINKOVITOSTI

Standardizirani protokoli za testiranje občutljivosti bakterij so veljavni za široko paleto mikroorganizmov, ni pa še enotnih kriterijev za določanje protimikrobne občutljivosti bakterij rodu *Campylobacter*. Obstajajo določena priporočila (British Society for Antimicrobial Chemotherapy, National Committee for Clinical Laboratory Standards) in zaradi tega se za testiranje občutljivosti bakterij uporabljajo številne metode, dilucijske in difuzijske (Luber in sod., 2003).

Izbira metode zavisi od mnogih zahtev, med drugimi od občutljivosti metode, enostavnosti izvedbe, fleksibilnosti in možne avtomatizacije metode (Woods in Washington, 1999). Na končni izid testa vpliva mnogo dejavnikov: metode separacije oz. ekstrakcije protimikrobnih snovi, volumen inokuluma, rastna faza, uporaba ravnega medija, pH medija ter čas in temperatura inkubacije.

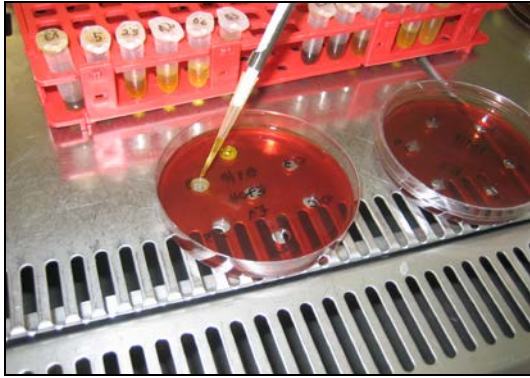
Metodo difuzije v agarju se najpogosteje uporablja kot presejalni test protimikrobne aktivnosti snovi, nakar sledijo bolj specifične študije. Najpogosteje priporočena metoda za ugotavljanje občutljivosti je dilucijska metoda v agarju, ki se pod mikroaerofilnimi pogoji izvaja na krvnem trdnem gojišču, vendar se zaradi dolgotrajnosti le redko uporablja v laboratorijih za rutinske preiskave. Nedavno je bila za ugotavljanje občutljivosti bakterij *C. jejuni* in *C. coli* standardizirana metoda mikrodilucije v bujonu, ki je zaradi večje enostavnosti bolj sprejemljiva in primerna za rutinske preiskave. Omogoča spremljanje odpornosti večjega števila izolatov (Luber in sod, 2002).

2.4.1 Difuzijske metode

Difuzijske metode se veliko uporabljajo za rutinske preiskave, omogočajo hitrejše rezultate, a imajo omejitve (Luber in sod., 2002). Engberg in sod. (1999) so ugotovili, da difuzijske metode dajejo nižje rezultate za vrednosti MIC kot druge metode.

2.4.1.1 Difuzijske metode v agarju z diski in luknjicami

Difuzijske metode v agarju z diski in luknjicami se uporabljajo za določanje občutljivosti bakterijskih izolatov za različna protimikrobna sredstva. Pri izvedbi te metode na inokuliran agar postavimo papirnat disk oz. v agarju oblikujemo luknjico, kamor nanese določeno količino protimikrobnega sredstva. Le-ta nato difundira skozi agar. Ko razdalja od diska/luknjice narašča, koncentracija protimikrobnega sredstva logaritemsko pada. Nastanejo inhibicijske cone. Čim širše so, tem bolj učinkovito je protimikrobno sredstvo. Metoda je tehnično preprosto izvedljiva in ponovljiva, reagenti so ekološko sprejemljivi, ne zahteva posebne opreme. Problem se pojavi pri izbiri mikroorganizmov, saj metoda ni standardizirana za vse mikroorganizme. Prav tako pa je slabost podajanje rezultatov MIC, kjer se lahko pojavijo večje napake. Rezultati so med različnimi študijami težko primerljivi (Woods in Washington, 1999). Pri metodi difuzije v agarju z luknjicami omogočimo dobro difuzijo protimikrobnega agensa, kar je lahko ovira pri metodi z diski.



Slika 5: Prikaz izvajanja difuzijske metode v agarju z luknjicami

2.4.2 Dilucijske metode

Dilucijske metode se uporabljajo za določanje minimalne koncentracije protimikrobnega agensa, ki je potreben, da ubije ali inhibira mikroorganizem. Protokoli za določanje protimikrobne inhibitorne aktivnosti so izpeljani z metodami v tekočih ali na trdnih gojiščih. Če protimikrobni agens razredčimo v trdnem gojišču, govorimo o dilucijski metodi v agarju. Če pa testirani agens razredčimo v tekočem gojišču, govorimo o makro- ali mikrodilucijski metodi v bujonu. Običajno so protimikrobni agensi testirani pri 2-kratnih serijskih razredčitvah v gojišču. Najnižja koncentracija, ki inhibira vidno rast testiranega organizma, je označena kot vrednost MIC.

2.4.2.1 Dilucijska metoda v agarju

Med dilucijske metode spadajo: metoda v agarju, makrodilucija v bujonu in mikrodilucija v bujonu. Dilucijska metoda v agarju je standardizirana in zanesljiva tehnika testiranja, ki jo lahko uporabimo kot referenčno metodo, za ovrednotenje drugih metod. V primerjavi z dilucijsko metodo v bujonu omogoča hitrejšo detekcijo kontaminacije. Največja slabost dilucijske metode v agarju je velika poraba materiala in časa (Woods in Washington, 1999).

Dilucijska metoda v agarju je najbolj priporočena metoda za ugotavljanje občutljivosti bakterij. Za testiranje občutljivosti bakterij *Campylobacter* se izvaja v mikroaerofilnih pogojih, na trdem krvnem gojišču (najpogosteje se uporablja gojišče Mueller-Hinton s 5% konjske ali ovčje krvi), vendar se zaradi dolgotrajnosti le redko uporablja v laboratorijih za rutinske preiskave. Omogoča sočasno testiranje večjega števila izolatov, opazna pa je tudi naključna kontaminacija in heterogenost mikroorganizmov na gojišču (Woods in Washington, 1999).

Dilucijska metoda v agarju je prva metoda, ki je bila standardizirana za določanje minimalne inhibitorne koncentracije (MIC) za *Campylobacter* (Luber in sod., 2002).

2.4.2.2 Makrodilucija v bujonu

Makrodilucijska metoda v bujonu je standardizirana in zanesljiva referenčna metoda, vendar pa zaradi težavnosti izvedbe za rutinske preiskave v laboratorijih slabo uporabna (Woods in Washington, 1999).

2.4.2.3 Mikrodilucija v bujonu

Mikrodilucijska metoda v bujonu je bila nedavno standardizirana za ugotavljanje občutljivosti bakterij *C. jejuni* in *C. coli* za nekatere antibiotike (McDermott in sod., 2005). Zaradi enostavnosti je bolj sprejemljiva in primerna za rutinske preiskave v laboratorijih ter omogoča spremljanje odpornosti večjega števila izolatov. Primerna je tudi za testiranje več protimikrobnih snovi proti enemu izolatu. Je hitra in ekonomsko ugodna metoda za ugotavljanje MIC (Woods in Washington, 1999). Rast spremljamo v gojišču na mikrotiterskih ploščah. Običajno so protimikrobni agensi testirani pri 2-kratnih serijskih razredčitvah v gojišču. Najnižja koncentracija agensa, ki inhibira vidno rast testiranega organizma, je označena kot MIC. Minimalno inhibitorno koncentracijo določamo na osnovi merjenja motnosti (optične gostote), fluorescence ali luminiscence gojišča. Vse troje je lahko znak rasti mikrobnih celic.

2.4.3 Kinetika rasti ali odmiranja

Bakteriocidni ali bakteriostatični učinek v odvisnosti od kontaktnega časa protimikrobnega sredstva lahko podamo s krivuljo inhibirane rasti ali krivuljo odmiranja. Najpogosteje uporabljene metode za določanje teh učinkov je merjenje optične gostote kot merila koncentracije celic v tekočem gojišču in štetje kolonijskih enot po nacepljanju in inkubaciji na trdnem gojišču (Burt, 2004).

2.4.4 Drugi načini

Spremljanje fizikalnih učinkov protibakterijske aktivnosti protimikrobnih snovi pa lahko poteka z elektronskim mikroskopom. Na ta način lahko raziskujemo poškodbe bakterijske celične stene in izgube celičnih vsebin. Pri pripravi vzorcev za elektronski mikroskop pa moramo zagotoviti, da so zaznane razlike med kontrolnimi in tretiranimi celicami posledica učinkov protimikrobnih snovi in ne metode priprave preparatov (Burt, 2004).

2.5 CILJI DIPLOMSKE NALOGE

Namen našega dela je bil preučiti protimikrobno delovanje ekstraktov rožmarina na bakterije *Campylobacter* z naslednjimi cilji:

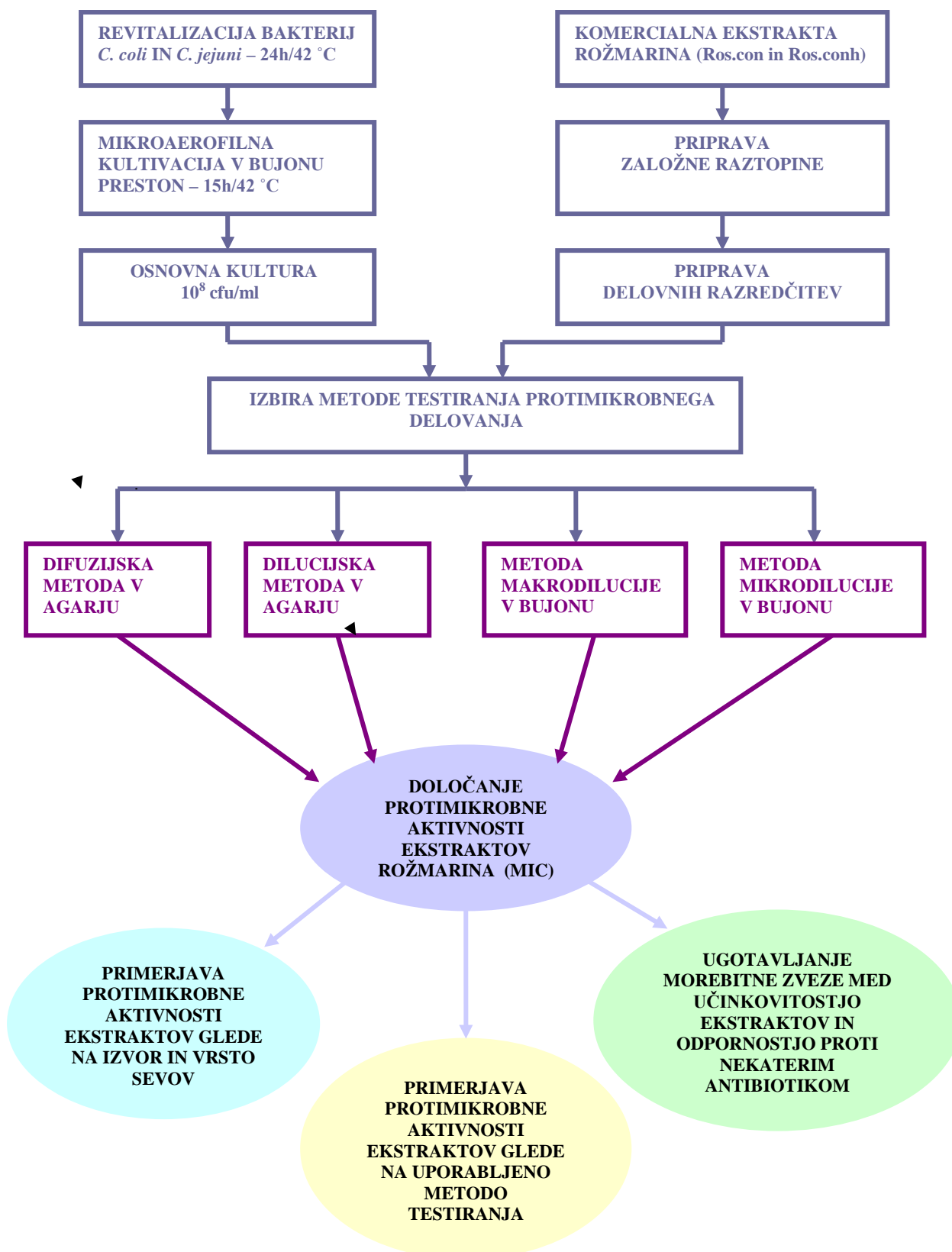
- Preizkusiti različne metode ugotavljanja protimikrobne aktivnosti rastlinskih ekstraktov pri bakterijah rodu *Campylobacter*.
- Izbrati optimalno metodo in jo uporabiti za določitev minimalnih inhibitornih koncentracij (MIC) ekstraktov rožmarina, ki inhibirajo rast različnih sevov bakterij *Campylobacter coli* in *Campylobacter jejuni*.
- Preučiti protimikrobno učinkovitost ekstraktov rožmarina in poiskati morebitno zvezo med učinkovitostjo ekstraktov in odpornostjo izolatov proti nekaterim antibiotikom.

2.6 DELOVNE HIPOTEZE

- Kampilobakterji rastejo v mikroaerofilnih pogojih, zato je potrebno izvedbo testiranja protimikrobne aktivnosti prilagoditi njihovim specifičnim ravnim zahtevam.
- Sestava rastlinskega ekstrakta vpliva na njegovo protibakterijsko učinkovitost. Pričakovali smo večji inhibitorni učinek ekstrakta Ros.conh, ki je vseboval večji delež karnozolne kisline.
- Odpornost kampilobakterjev je sevno specifična.
- Obstaja verjetnost, da je odpornost bakterij *Campylobacter* proti ekstraktom rožmarina povezana z njihovo odpornostjo proti drugim protimikrobnim sredstvom (preverjali smo morebitno povezanost z odpornostjo proti antibiotikoma ciprofloksacin in eritromicin).

3.0 MATERIAL IN METODE DELA

3.1 POTEK DELA



Slika 6: Shema poskusa

3.2 MATERIAL

3.2.1 Mikroorganizmi

Pri poskusih smo uporabili izolate bakterij *C. jejuni* in *C. coli*, namnožene na selektivnem, krvnem agarju Columbia. Testne kulture so bile izolirane iz piščančjega mesa, piščancev na farmi ali iz humanega kliničnega materiala. Kulture so bile shranjene v tekočem gojišču BHI z dodatkom glicerola in defibrilirane konjske krvi pri temperaturi $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Zorman in Smole Možina, 2002). Pred vsako uporabo smo bakterije 24 ur inkubirali na trdnem gojišču Columbia, v mikroaerofilni atmosferi (3 % kisika, 10 % ogljikovega dioksida, 87 % dušika) pri $42\text{ }^{\circ}\text{C}$. Tako namnožene bakterije smo uporabili v nadaljnjih postopkih poskusa.

3.2.2 Mikrobiološka gojišča

3.2.2.1 Tekoče gojišče Preston

Sestavine:

- 12,5 g osnovnega hranilnega medija Nutrient Broth No.2 (Oxoid, CM67)
- 500 ml destilirane vode
- 25 ml defibrilirane konjske krvi (Oxoid, SR048C)
- 1 steklenička dodatka za rast *Campylobacter* Growth Supplement (Oxoid, SR232E)
- 1 steklenička dodatka za selektivnost *Campylobacter* Selective Supplement (Oxoid, 204E)

Preglednica 3: Sestava osnovnega medija za tekoče gojišče Preston

Sestavine	Količina (g/l)
Mesni ekstrakt	10,0
Pepton	10,0
Natrijev klorid	5,0
Agar	1,0

Preglednica 4: Sestava dodatka za rast *Campylobacter* Growth Supplement (Oxoid, SR232E)

Sestavine	Količina (mg/l)
Natrijev piruvat	250,0
Natrijev metabisulfat	250,0
Železov sulfat	250,0

Preglednica 5: Sestava dodatka za selektivnost *Campylobacter* Selective Supplement (Oxoid, SR204E)

Sestavine	Količina (mg/l)
Polimiksin B	5000 I.U./l
Rifampicin	10,0 mg/l
Trimetoprim	10,0 mg/l
Amfotericin	10,0 mg/l

Priprava:

12,5 g hranilnega medija raztopimo v 500 ml destilirane vode in nato steriliziramo 15 minut pri temperaturi $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ in tlaku 1,1 bar. Po sterilizaciji medij v vodni kopeli ohladimo na $45\text{ }^{\circ}\text{C}$ in mu aseptično dodamo 25 ml defibrilirane konjske krvi, raztopino dodatka za rast ter

raztopino dodatka za selektivnost. Vse skupaj dobro premešamo in gojišče Preston shranimo na 4 °C do uporabe. Kri dodamo v gojišče tik pred uporabo.

3.2.2.2 Krvni agar Columbia

Sestavine:

- 19,5 g osnovnega medija Columbia Agar Base (Oxoid, CM331)
- 500 ml destilirane vode
- 25 ml sterilne defibrilirane konjske krvi (Oxoid, SR048C)
- 1 steklenička dodatka za rast *Campylobacter* Growth Supplement (Oxoid, SR232E)
- 1 steklenička dodatka za selektivnost *Campylobacter* Selective Supplement (Oxoid, SR069E)

Preglednica 6: Sestava osnovnega medija za krvni agar Columbia

Sestavine	Količina (g/l)
Pepton	23,0
Škrob	1,0
Natrijev klorid	5,0
Agar	8,0-18,0

Preglednica 7: Sestava dodatka za selektivnost *Campylobacter* Selective Supplement (Oxoid, SR069E)

Sestavine	Količina
Vankomicin	10mg/l
Polimiksin B	2500 I.U./l
Trimetoprim	5mg/l

Priprava:

19,5 g osnovnega medija raztopimo v 500 ml destilirane vode in ga steriliziramo 15 minut pri temperaturi 121 °C in tlaku 1,1 bar. Medij ohladimo na 45 °C, dodamo 25 ml sterilne defibrilirane konjske krvi, raztopino dodatka za rast ter raztopino dodatka za selektivnost. Gojišče previdno premešamo, da preprečimo pretirano penjenje in ga razlijemo v petrijevke. Ohlajenega do uporabe hranimo pri temperaturi 4 °C.

3.2.2.3 Agar Karmali

Sestavine:

- 23,35 g osnovnega medija *Campylobacter* Agar Base Karmali (Oxoid, CM0935)
- 500 ml destilirane vode
- 1 steklenička dodatka za selektivnost Karmali Selective Supplement (Biokar Diagnostics, SM017)

Preglednica 8: Sestava osnovnega medija za agar Karmali

Sestavine	Količina (g/l)
Osnovni medij Columbia	39,0
Aktivno oglje	4,0

Hematin	0,032
---------	-------

Preglednica 9: Sestava dodatka za selektivnost Karmali Selective Supplement (Biokar Diagnostic, SM017)

Sestavine	Količina (mg/l)
Vankomicin	20,0
Cefoperazon	32,0

Priprava:

23,35 g osnovnega medija Karmali raztopimo v 500 ml destilirane vode in ga steriliziramo 15 minut pri temperaturi 115 °C in tlaku 1,1 bar. Medij ohladimo na 45 °C, mu dodamo raztopino dodatka za selektivnost, dobro premešamo in ga razlijemo v petrijevke. Ohlajenega do uporabe hranimo pri temperaturi 4 °C.

3.2.2.4 Agar CCDA

Sestavine:

- Osnovni medij CCDA (Oxoid, CM739)
- 500 ml destilirane vode

Preglednica 10: Sestava osnovnega medija za agar CCDA

Sestavine	Količina (g/l)
Hranilni bujon	25,0
Aktivno oglje	4,0
Hidroliziran kazeinat	3,0
Železov sulfat	0,25
Natrijev piruvat	0,25
Agar	12,0

Preglednica 11: Sestava dodatka za selektivnost CCDA Selective Supplement (Oxoid, SR155E)

Sestavine	Količina (mg/l)
Cefoperazon	64,0
Amfotericin	20,0

Priprava:

22,75 g osnovnega medija za agar CCDA raztopimo v 500 ml destilirane vode in ga steriliziramo 15 minut pri temperaturi 121 °C in tlaku 1,1 bar. Medij ohladimo na 45 °C, mu dodamo raztopino CCDA dodatka za selektivnost (Oxoid, SR155E), dobro premešamo in ga razlijemo v petrijevke.

3.2.2.5 Krvni agar Mueller Hinton

Sestavine:

- Osnovni medij Mueller Hinton (Oxoid, CM0337)
- 500 ml destilirane vode

- 25 ml sterilne defibrilirane konjske krvi (Oxoid, SR048C)

Preglednica 12: Sestava osnovnega medija za krvni agar Mueller Hinton

Sestavine	Količina (g/l)
Mesni ekstrakt	300,0
Hidroliziran kazeinat	17,5
Škrob	1,5
Agar	17,0

Priprava:

19 g osnovnega medija raztopimo v 500 ml destilirane vode in ga steriliziramo 15 minut pri temperaturi 115 °C in tlaku 1,1, bar. Medij ohladimo na 45 °C, mu aseptično dodamo 25 ml sterilne defibrilirane konjske krvi, dobro premešamo in ga razlijemo v petrijevke. Ohlajenega do uporabe hranimo pri temperaturi 4 °C.

3.2.2.6 Tekoče gojišče Mueller Hinton

Sestavine:

- Osnovni medij Mueller Hinton (Oxoid, CM0405)
- 500 ml destilirane vode
- 25 ml sterilne defibrilirane konjske krvi (Oxoid, SR048C)
- 1 steklenička dodatka za rast *Campylobacter* Growth Supplement (Oxoid, SR232E)
- 1 steklenička dodatka za selektivnost *Campylobacter* Selective Supplement (Oxoid, SR204E)

Preglednica 13: Sestava osnovnega medija za bujon Mueller Hinton

Sestavine	Količina (g/l)
Mesni ekstrakt	300,0
Hidroliziran kazeinat	17,5
Škrob	1,5

Priprava:

10,5 g osnovnega medija raztopimo v 500 ml destilirane vode in steriliziramo 15 minut pri temperaturi 115 °C in tlaku 1,1 bar. Po sterilizaciji ohladimo medij v vodni kopeli, na 45 °C in mu aseptično dodamo 25 ml defibrilirane konjske krvi, raztopino dodatka za rast ter raztopino dodatka za selektivnost. Vse skupaj dobro premešamo in pripravljeno gojišče hranimo pri temperaturi 4 °C. Če ne potrebujemo celotnega gojišča takoj, mu dodamo kri tik pred uporabo.

3.2.3 Raztopine in dodatki

3.2.3.1 Fiziološka raztopina

Sestavine za pripravo raztopine KH_2PO_4 :

- 3,4 g KH_2PO_4 (Kemika)

- 1100 ml destilirane vode

Priprava:

3,4 g KH_2PO_4 raztopimo v 100 ml destilirane vode (pH= 7,2); 1,25ml pripravljene osnovne raztopine razredčimo v 1000 ml destilirane vode. Dobro premešamo in steriliziramo v avtoklavu 15 minut pri temperaturi 121 °C.

3.2.3.2 Dodatki

- diski z znano koncentracijo antibiotikov
- Tween 80
- Barvilo BacTiter-Glo™ (Promega Corporation, Madison, USA)

3.2.4 Priprava ekstraktov

3.2.4.1 Ekstrakti

- Komercialno pripravljene ekstrakti Ros.con in Ros.conh (Vitiva, Slovenija)
- Ros.con vsebuje 22,04 % karnozolne kisline
- Ros.conh vsebuje 40,49 % karnozolne kisline

3.2.4.2 Priprava ustreznih koncentracij ekstrakta rožmarina

Sestavine:

- ekstrakti Ros.con in Ros.conh (Vitiva, Slovenija)
- absolutni etanol (Merck)

Priprava:

V absolutnem etanolu smo pripravili 10 % ali 16 % založno raztopino ekstraktov, ki smo ju uporabljali za vse nadaljnje razredčitve. Pripravljene 10 % raztopine ekstraktov Ros.con in Ros.conh sta vsebovali 2,204 % in 4,049 % karnozolne kisline. Pripravljene 16 % raztopine ekstraktov Ros.con in Ros.conh pa sta vsebovali 3,526 % in 6,478 % karnozolne kisline.

3.2.5 Laboratorijska oprema

- splošna mikrobiološka oprema:
cepilne zanke, avtomatske pipete (Gilson, Eppendorf), nastavki za pipete -10 µl, 100 µl in 1000 µl (Eppendorf, Plastibrand), epice (Eppendorf), petrijeve plošče (Laboratorij Goliass), bele mikrotitrne ploščice z ravnim dnom (Nunc), laboratorijske steklenice - 250 ml, 500 ml, 1000 ml (Duran), merilni valji (Plastibrand), plastični lončki (Laboratorij Goliass), plastične kivete, pipetor (Eppendorf easypet), parafilm »M« (American National Can), plinski gorilnik, pinceta, steklovina
- zaščitna mikrobiološka komora SMBC 122AV (Iskra PIO, Slovenija)
- avtoklav (Sutjeska, Beograd)
- sušilnik (SO-250, Elektromedicina)
- digestorij (TIP382, Med-lab Rauh)

- tehtnica Sartorius analytic
- tehtnica (Mettler Toledo)
- inkubator (Kambič SP190, Slovenija)
- mikrovalovna pečica (Cook n'grill 1300, Sanyo)
- zmrzovalnik (LTH, Slovenija)
- zmrzovalna omara (-80 °C, Heto Ultra Freeze)
- hladilnik (Bosch)
- čitalec mikrotitrskih ploščic Tecan Safire 2
- vrtinčnik (Yellowline, IKA)
- plinski gorilnik
- plinska bomba z mikroaerofilno atmosfero-3% O₂, 10% CO₂, 87% N₂ (Istragas)
- steklene kroglice (G-9268, Sigma)
- ključek za oblikovanje luknjic v agarju
- anaerobni lonci (Anaerobar 2,5l, Oxoid Ago 25A)
- injekcijske brizgalke (PB Plastik, 10ml)
- ohišje za filter (Millipore, CAT.10, SX0001300)
- filtrirni papir (Millipore; Isopore membrane filters 0,2µm, GTBP)
- programska oprema: Microsoft office, programski paket Magellan

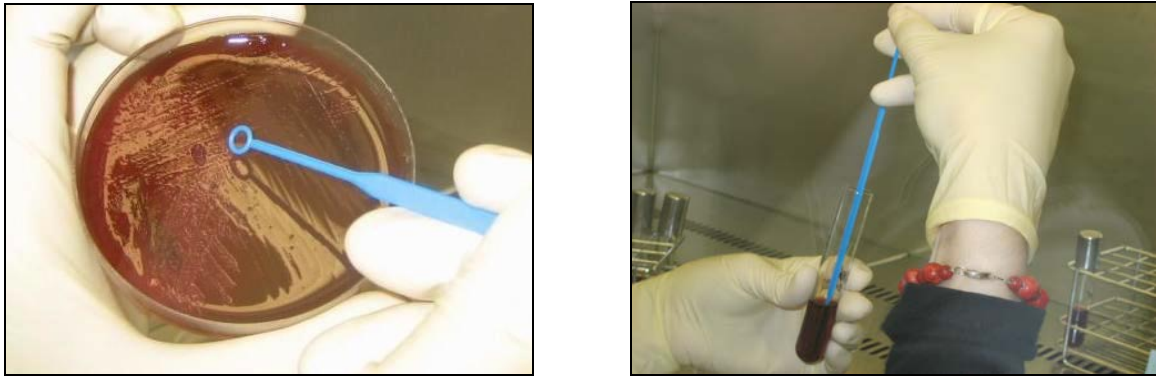
3.3 METODE DELA

3.3.1 Revitalizacija bakterij

Izolate bakterij *C. jejuni* in *C. coli*, shranjene pri temperaturi -80 °C, smo s cepilno zanko v mikrobiološki komori prenesli na trdno gojišče Columbia. Petrijeve plošče smo zložili v anaerobne lonce in jih mikroaerofilno inkubirali pri temperaturi 42 °C, 24 do 48 ur oz. do pojava tipičnih kolonij bakterij *C. jejuni* in *C. coli*.

3.3.2 Priprava inokuluma

Po 24 urni inkubaciji smo izvedli pregled rasti in ugotavljali prisotnost značilnih kolonij na selektivnem gojišču. Za vsak sev smo pripravili epruveto z bujonom (4 ml tekočega gojišča Preston in 5 % sterilne konjske krvi) in v njih s cepilno zanko dodali biomaso iz gojišča Columbia. Vsebinsko epruvet smo premešali na vrtinčniku in jih ponovno mikroaerofilno, v anaerobnih loncih, inkubirali 15 ur pri temperaturi 42 °C. Tako smo dosegli ustrezno koncentracijo celic v zgodnji stacionarni fazi rasti.



Slika 7 in 8: Prikaz precepljanja celične kulture s cepilno zanko v tekoče gojišče Preston

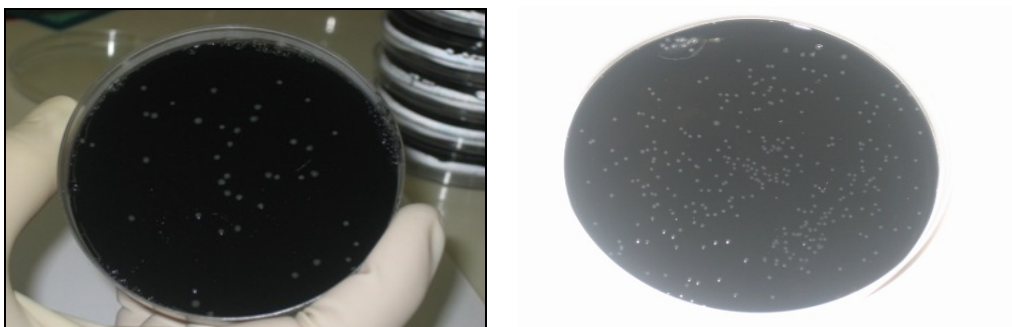
3.3.3 Določanje koncentracije celic v inokulumu

Ker je za vsako uporabljeno metodo ugotavljanja občutljivosti bakterij pomembna koncentracija celic, smo vzporedno z vsako metodo določali tudi število za delitev sposobnih celic v inokulumu. Določali smo ga kot cfu/ml vzorca (cfu - Colony Forming Unit), na selektivnem gojišču Karmali. Kultivabilnost je odvisna od rastne faze, od števila celic in od sposobnosti celic za delitev. Na gojišču zrastejo samo zdrave, nepoškodovane celice, medtem ko poškodovane celice ali celice, ki so izgubile sposobnost delitve na standardnih gojiščih, ne zrastejo.

Aseptično smo odpipetirali 0,1 ml inokuluma iz gojišča Preston v sterilno epico in razredčevali po Kochu do $\sim 10^2$ in $\sim 10^1$ cfu/ml vzorca. Po razredčevanju smo iz epice, razredčene do -6 in -7 vzeli po 0,1 ml vzorca in ga aseptično odpipetirali na agar Karmali ter ga s sterilno palčko razmazali po gojišču. Petrijevke smo inkubirali mikroaerofilno pri temperaturi 42 °C, 24-72 ur. Po inkubaciji smo ob gorilniku prešteli kolonije na ploščah, na katerih je zraslo od 10 do 300 kolonij. Za izračun povprečne koncentracije smo uporabili enačbo:

$$cfu/ml = kolonij \times R \quad \dots(1)$$

R...faktor razredčitve



Slika 9 in 10: Kolonije bakterij *Campylobacter* na selektivnem gojišču Karmali

3.3.4 Difuzijska metoda ugotavljanja protimikrobnega delovanja ekstraktov

3.3.4.1 Priprava materiala

- Mueller-Hinton agar (Oxoid, CM0337) + 5 % sterilne konjske krvi
- tekoče gojišče Preston z dodatki za rast in selektivnost
- fiziološka raztopina
- selektivna gojišča (Karmali in Columbia)
- absolutni etanol

3.3.4.2 Priprava ustreznih koncentracij ekstrakta rožmarina

- Pripravili smo 10 % raztopino obeh ekstraktov rožmarina v absolutnem etanolu
- Iz 10 % raztopine ekstrakta smo pripravili serije dvakratnih razredčitev ekstrakta v absolutnem etanolu (do 0,3 % koncentracije)

3.3.4.3 Izvedba metode

1 ml pripravljenega inokuluma čiste kulture smo inokulirali v prazno, sterilno petrijevko, prelili z MH agarjem, ki smo mu tik pred tem dodali 5 % sterilne konjske krvi ter previdno premešali. Ko se je agar strdil, smo s ključkom za oblikovanje luknjic v agarju naredili luknjice in pri tem pazili, da so dovolj narazen. V pripravljene in na petrijevkah označene luknjice smo dodali 50 µl ekstrakta (s koncentracijami: 10 %, 5 %, 2,5 %, 1,25 %, 0,6 %, 0,3 %). Kot pozitivno kontrolo smo uporabili disk, prepojen z antibiotikom (NA30), kot negativno pa smo v luknjico dodali absolutni etanol. Petrijeve plošče smo inkubirali s pokrovom navzgor 24 ur, mikroaerofilno, pri temperaturi 42 °C. Po 24 urni inkubaciji smo odčitali cone inhibicije rasti okoli luknjic v agarju.

3.3.5 Dilucijska metoda v agarju

3.3.5.1 Priprava materiala

- Mueller-Hinton agar (Oxoid, CM0337) + 5 % sterilne konjske krvi
- tekoče gojišče Preston z dodatki za rast in selektivnost
- fiziološka raztopina
- selektivna gojišča (Karmali in Columbia)
- absolutni etanol
- detergent Tween 80

3.3.5.2 Priprava ustreznih koncentracij ekstrakta rožmarina v gojišču

- Pripravili smo 16 % raztopino ekstrakta rožmarina v absolutnem etanolu (3,2 g ekstrakta/20 ml EtOH) in izračunali, koliko 16 % raztopine ekstrakta potrebujemo za 150 ml, da bo končna koncentracija 2 %, 1 %, 0,5 %, 0,25 %, 0,125 % ekstrakta v agarju.
- Pripravili smo razredčitve ekstrakta v MH gojišču.

- Po avtoklaviranju MH agarja, ohlajenega na 48 °C, smo dodali 5 % sterilne konjske krvi, detergent Tween 80 (0,5 % v gojišču) ter ustrezen volumen pripravljenega ekstrakta.

3.3.5.3 Izvedba metode

Priporočena koncentracija celic v inokulumu pri dilucijski metodi v agarju je $\sim 10^4$ cfu/ml. Pripravili smo razredčitve kulture v fiziološki raztopini ($\sim 10^5$ cfu/ml) in tako dobili standardiziran inokulum.

30 μ l suspenzije čiste kulture smo injicirali na strjeni MH agar v malih petrijevkah in jo s pomočjo sterilnih steklenih kroglic razmazali po površini. Kot pozitivno kontrolo smo uporabili MH gojišče brez dodanega protimikrobnega agensa. Petrijeve plošče smo inkubirali s pokrovom navzdol, mikroaerofilno, pri temperaturi 42 °C. Inkubacija je trajala 48 ur. Po inkubaciji smo določali minimalno inhibitorno koncentracijo (MIC), najnižjo koncentracijo ekstrakta v gojišču, ki je inhibirala rast bakterij.

Vzporedno smo določali število celic v inokulumu s štetjem kolonij na selektivnem gojišču Karmali na enak način, kot je opisano v točki 3.3.3.

3.3.6 Makrodilucijska metoda v bujonu – Ugotavljanje kinetike protimikrobnega delovanja ekstraktov rožmarina pri bakterijah *Campylobacter*

3.3.6.1 Priprava materiala:

- tekoče gojišče Preston z dodatki za rast in selektivnost
- selektivna gojišča (Columbia, Karmali)
- fiziološka raztopina
- absolutni etanol
- detergent Tween 80
- sterilna konjska kri

3.3.6.2 Priprava ustreznih koncentracij ekstrakta rožmarina v gojišču

- Pripravili smo 16 % raztopino ekstrakta rožmarina v absolutnem etanolu (3,2 g ekstrakta/20 ml EtOH) in izračunali, koliko 16 % raztopine ekstrakta potrebujemo za 150 ml, da bo končna koncentracija 2 %, 1 %, 0,5 %, 0,25 %, 0,125 % ekstrakta v agarju.

3.3.6.3 Izvedba metode

Pripravili smo 10-kratno razredčitev 15-h kulture v fiziološki raztopini. Nato smo 0,1 ml aseptično prenesli v sterilno epruveto, kjer smo že prej pripravili 4 ml tekočega gojišča Preston, 0,2 ml sterilne konjske krvi, 0,02 ml (20 μ l) detergenta Tween 80 in izračunan volumen 16 % ekstrakta rožmarina. Ko je kultura inokulirana, dobro premešana, vzamemo 0,1 ml kulture in jo s sterilno palčko razmažemo po selektivnem gojišču

Karmali, da lahko določimo CFU/ml ob inokulaciji. Inokulirano kulturo v ekstraktu smo inkubirali na 42 °C, v mikroaerofilni atmosferi. Vzorčili smo še po 8 in 24 h inkubacije.

Koncentracijo dodanega ekstrakta, ki smo ga dodali v gojišče, smo izbrali na podlagi rezultatov dilucijske metode v agarju.

3.3.7 Mikrodilucijska metoda v bujonu

3.3.7.1 Priprava materiala

- Mueller-Hinton agar (Oxoid, CM0337) + 5 % sterilne konjske krvi
- Mueller-Hinton bujon (Oxoid, CM0405)
- mikrotiterske plošče s pokrovom
- fiziološka raztopina
- selektivno gojišče CCDA
- barvilo BacTiter-Glo™

3.3.7.2 Priprava ustreznih koncentracij ekstrakta rožmarina v gojišču

- Pripravili smo 32 % raztopino ekstrakta rožmarina v absolutnem etanolu (1,6 g ekstrakta/5 ml EtOH) in 1 ml take raztopine dodali 1 ml Mueller-Hinton bujona, da smo dobili 16 % raztopino ekstrakta.
- Končne koncentracije (8 %, 4 %, 2 %, 1 %, 0,5 % in 0,25 %) smo dobili z 2-kratnim razredčevanjem z bakterijsko kulturo.

3.3.7.3 Izvedba metode

Za pripravo inokuluma smo prenesli 150 µl namnožene 15-h kulture v 10 ml MH bujona.

Na mikrotiterskih ploščah smo pripravili serijo razredčitev testiranega agensa. Z avtomatsko pipeto smo prenesli v prvo vrsto na plošči 100 µl začetne koncentracije ekstrakta, v vse ostale v kolonah pa 50 µl steriliziranega tekočega MH bujona. Nato smo iz prve vrste vdolbin odpipetirali 50 µl ekstrakta in prenesli v drugo vrsto vdolbin. Vsebinsko smo premešali s pipeto in zopet 50 µl prenesli v tretjo vrsto vdolbin. S tem smo nadaljevali po koloni navzdol, pri tem je koncentracija ekstrakta padala. Na ta način smo pripravili dvakratne razredčitve ekstrakta.

V vse luknjice smo na koncu dodali še 50 µl čiste kulture *Campylobacter*. Mikrotitersko ploščo smo prekrili s pokrovom. Ploščo smo vstavili v vrečo, ki smo jo zavarili, naredili smo dve luknjici za prepihanje s plinom in nato še enkrat zavarili. Inkubirali smo pri 42 °C, 24 h, mikroaerofilno. Po inkubaciji smo v vsako luknjico dodali še 100 µl barvila. Po petih minutah smo izmerili luminiscenco, ki se izraža v RLU (angl., relative luminiscence units). Kot pozitivno kontrolo smo v luknjice vstavili 50 µl MHB, 50 µl kulture in 100 µl barvila BacTiter Glo™. V slepem vzorcu pa smo imeli 100 µl MHB in 100 µl kulture.

3.3.8 Statistična obdelava rezultatov

3.3.8.1 Povprečna vrednost

Po štetju celic, določanju kultivabilnosti in izvedbi vseh metod v dveh paralelkah smo rezultate podali kot povprečno vrednost (\bar{X}), ki smo jo dobili s pomočjo enačbe (2). Prav tako pa smo enačbo uporabili tudi pri izračunu povprečnih vrednosti za obdelavo rezultatov pri dilucijski metodi v agarju.

$$\bar{X} = \frac{\sum_{i=1}^n X_i}{n}$$

nštevilo vzorcev

X_i....vrednost i-te meritve

.....(2)

4 REZULTATI

4.1 REZULTATI DIFUZIJSKE METODE V AGARJU

Za difuzijsko metodo v agarju smo uporabili 40 izolatov bakterije *Campylobacter coli* in *Campylobacter jejuni*, od tega je bilo 5 izolatov živalskega izvora, 26 živilskega in 9 humanega izvora.

Preglednica 14: Rezultati protimikrobnega delovanja dveh ekstraktov rožmarina z difuzijsko metodo (navedene so najmanjše količine ekstraktov, ki so povzročile inhibicijo bakterijske rasti na agarju)

Oznaka sevov	Vrsta	Ros.con mg/ml ekstr.	Ros.con mg/luk	Ros.conh mg/ml ekstr.	Ros.conh mg/luk
Živalski izolati					
15/F	<i>C. coli</i>	50	2,5	25	1,25
16/F	<i>C. coli</i>	50	2,5	25	1,25
21/F	<i>C. coli</i>	50	2,5	25	1,25
27/F	<i>C. coli</i>	25	1,25	25	1,25
49/F	<i>C. coli</i>	25	1,25	25	1,25
Živilski izolati					
K27/2	<i>C. coli</i>	50	2,5	25	1,25
K28/1	<i>C. jejuni</i>	25	1,25	25	1,25
K29/1	<i>C. jejuni</i>	50	2,5	50	2,5
K29/3	<i>C. jejuni</i>	12,5	0,63	12,5	0,63
K29/5	<i>C. jejuni</i>	50	2,5	50	2,5
K31/1	<i>C. coli</i>	25	1,25	12,5	0,63
K32/1	<i>C. coli</i>	25	1,25	25	1,25
K32/3	<i>C. coli</i>	100	5	100	5
K33/1	<i>C. coli</i>	12,5	0,63	25	1,25
K34/1	<i>C. jejuni</i>	100	5	25	1,25
K34/3	<i>C. jejuni</i>	25	1,25	50	2,5
K38/5	<i>C. coli</i>	50	2,5	25	1,25
K40/1	<i>C. coli</i>	50	2,5	25	1,25
K43/4	<i>C. jejuni</i>	25	1,25	12,5	0,63
K43/5	<i>C. coli</i>	25	1,25	12,5	0,63
K45/2	<i>C. coli</i>	50	2,5	50	2,5
K49/2	<i>C. jejuni</i>	50	2,5	50	2,5
K56/3	<i>C. coli</i>	50	2,5	50	0,63
114P	<i>C. coli</i>	12,5	0,63	25	1,25
116P	<i>C. coli</i>	50	2,5	12,5	0,63
128P	<i>C. jejuni</i>	25	1,25	25	1,25
131P	<i>C. coli</i>	100	5	100	5
132P	<i>C. jejuni</i>	25	1,25	12,5	0,63
137	<i>C. coli</i>	25	1,25	50	2,5
158	<i>C. jejuni</i>	25	1,25	50	2,5
197	<i>C. jejuni</i>	12,5	0,63	25	1,25
Humani izolati					
03/216	<i>C. jejuni</i>	25	1,25	12,5	0,63
03/428	<i>C. jejuni</i>	25	1,25	12,5	0,63
03/720	<i>C. jejuni</i>	25	1,25	25	1,25
03/968	<i>C. jejuni</i>	25	1,25	25	1,25
03/1019	<i>C. coli</i>	50	2,5	25	1,25
9249	<i>C. coli</i>	25	1,25	25	1,25
11272	<i>C. coli</i>	25	1,25	25	1,25
19809	<i>C. jejuni</i>	100	5	50	2,5
28233/01	<i>C. jejuni</i>	25	1,25	50	2,5

Za vsak sev smo uporabili 6 različnih koncentracij obeh ekstraktov (od 0,3 % do 10 %), v preglednici pa so podane najmanjše količine, ki so povzročile vsaj minimalno inhibicijsko cono. Minimalne inhibitorne koncentracije se gibljejo od 12,5 mg/ml do 100 mg/ml oz. od 0,63 mg ekstrakta/luknjico do 5 mg ekstrakta/luknjico. Iz preglednice 14 je razvidno, da je bila v povprečju za inhibicijo rasti bakterij *C. coli* in *C. jejuni* potrebna manjša količina ekstrakta Ros.conh (40,49 % karnozolne kisline), kot ekstrakta Ros.con (22,04 % karnozolne kisline). Pri izolatih živalskega izvora je bilo za inhibicijo rasti na agarju v povprečju potrebno 2 mg/luknjico ekstrakta Ros.con in 1,25 mg/luknjico ekstrakta Ros.conh. Pri izolatih živilskega izvora je bilo za inhibicijo rasti potrebno 2,02 mg/luknjico ekstrakta Ros.con in 1,71 mg/luknjico ekstrakta Ros.conh. Pri izolatih humanega izvora pa je bilo za inhibicijo rasti potrebno 1,80 mg/luknjico ekstrakta Ros.con in 1,25 mg/luknjico ekstrakta Ros.conh. Glede na poreklo izolatov je bilo za inhibicijo rasti potrebno največ ekstrakta za izolate živilskega izvora. Med vrstama *C. coli* in *C. jejuni* ni bilo opazne razlike v minimalnih inhibitornih količinah nobenega od obeh ekstraktov.

Glede na to, da smo v inhibitornih količinah ekstraktov opazili razlike znotraj sevov enakega izvora, smo pri naslednji metodi v eksperiment vpeljali večje število sevov.

4.2 REZULTATI DILUCIJSKE METODE V AGARJU

Dilucijsko metodo v agarju smo izvedli na 63 sevih, od tega je bilo 6 sevov živalskega izvora, 37 živilskega izvora in 20 humanega izvora. Vrsti *C. coli* je pripadalo 37 izolatov, vrsti *C. jejuni* pa 26 izolatov. Primerjali smo učinkovitost ekstraktov Ros.con in Ros.conh med posameznimi sevi glede na izvor in vrsto. Podatke smo primerjali z že zbranimi podatki o občutljivosti sevov za antibiotika ciprofloksacin in eritromicin. Podatke minimalnih inhibitornih koncentracij smo podali v mg/ml in v odstotkih; podani so v preglednici 15.

Preglednica 15: Rezultati protimikrobnega delovanja ekstraktov rožmarina na bakterije *Campylobacter* z dilucijsko metodo v agarju (navedene so najmanjše koncentracije, ki so inhibirale rast bakterij na agarški plošči; v tabelo so vnešeni še podatki o občutljivosti (S), ali odpornosti (R) testiranih sevov za antibiotika ciprofloksacin (CIP) in eritromicin (E)

Izolati	Vrsta	Ros.con (MIC)		CIP	E
		mg/ml ekstr.	mg/ml ekstr.		
Živalski izolati					
15/F	<i>C. coli</i>	1,25	1,25	S	S
16/F	<i>C. coli</i>	2,5	2,5	S	S
21/F	<i>C. coli</i>	2,5	5	S	R>256µg/ml
27/F	<i>C. coli</i>	10	10	S	S
31/F	<i>C. jejuni</i>	2,5	1,25	R	ni podatka
49/F	<i>C. coli</i>	5	1,25	S	S
Živilski izolati					
K27/2	<i>C. coli</i>	5	10	R>32µg/ml	S
K28/1	<i>C. jejuni</i>	20	10	S	S
K29/1	<i>C. jejuni</i>	20	10	S	S
K29/3	<i>C. jejuni</i>	5	2,5	S	S
K29/5	<i>C. jejuni</i>	5	5	S	S
K31/1	<i>C. coli</i>	5	10	R>32µg/ml	S
K32/1	<i>C. coli</i>	5	10	R>32µg/ml	S
K32/3	<i>C. coli</i>	2,5	2,5	R>32µg/ml	S
K33/1	<i>C. coli</i>	2,5	1,25	S	S
K34/1	<i>C. jejuni</i>	5	5	R>32µg/ml	S
K34/3	<i>C. jejuni</i>	2,5	2,5	S	S
K35/1	<i>C. jejuni</i>	10	5	S	S
K35/2	<i>C. jejuni</i>	10	5	S	S
K38/5	<i>C. coli</i>	5	5	R>32µg/ml	S
K39/1	<i>C. coli</i>	10	5	R>32µg/ml	S
K40/1	<i>C. coli</i>	5	5	R>32µg/ml	S
K40/2	<i>C. coli</i>	5	10	R>32µg/ml	S
K43/4	<i>C. jejuni</i>	5	5	S	S
K43/5	<i>C. coli</i>	2,5	2,5	S	S
K44/3	<i>C. coli</i>	2,5	2,5	S	R>256µg/ml
K45/2	<i>C. coli</i>	5	5	S	S
K46/1	<i>C. coli</i>	2,5	2,5	S	S
K48/1	<i>C. coli</i>	5	2,5	S	S
K49/2	<i>C. jejuni</i>	10	5	S	S
K50/2	<i>C. coli</i>	5	5	S	S
K51/1	<i>C. coli</i>	10	5	S	R>32µg/ml
K53/3	<i>C. coli</i>	2,5	2,5	S	S
K55/2	<i>C. jejuni</i>	5	2,5	S	S
K56/3	<i>C. coli</i>	10	5	S	S
72/P	<i>C. coli</i>	20	20	S	S
96/P	<i>C. jejuni</i>	10	5	S	S
100/P	<i>C. coli</i>	10	10	S	S
137	<i>C. coli</i>	5	5	S	R
140	<i>C. coli</i>	5	10	S	R
158	<i>C. jejuni</i>	5	5	S	S
171	<i>C. coli</i>	5	10	S	R
197	<i>C. jejuni</i>	5	5	S	S
Humani izolati					
03/216	<i>C. jejuni</i>	10	5	S	S
03/890	<i>C. coli</i>	5	2,5	S	S
03/968	<i>C. jejuni</i>	10	5	S	S
03/1019	<i>C. coli</i>	20	10	S	S
03/1080	<i>C. coli</i>	2,5	2,5	R	S
4442	<i>C. coli</i>	10	10	S	S
9249	<i>C. coli</i>	5	2,5	S	S
11146	<i>C. jejuni</i>	5	5	S	S
11272	<i>C. coli</i>	10	5	R	S
19809	<i>C. jejuni</i>	5	5	S	S
21697	<i>C. coli</i>	5	5	S	S
21823	<i>C. jejuni</i>	5	2,5	S	S
28233/01	<i>C. jejuni</i>	10	20	R	R
28264/01	<i>C. jejuni</i>	5	2,5	S	R
28439/01	<i>C. jejuni</i>	5	2,5	R	R
28833/01	<i>C. coli</i>	5	2,5	S	S
5815/02	<i>C. coli</i>	10	5	S	R
75	<i>C. jejuni</i>	2,5	2,5	S	S
428	<i>C. jejuni</i>	10	10	S	S
723	<i>C. jejuni</i>	2,5	5	S	S

Iz preglednice 15 je razvidno, da se minimalne inhibitorne koncentracije med izolati razlikujejo. Povprečna minimalna inhibitorna koncentracija ekstrakta Ros.con za vse izolate je znašala 6,65 mg/ml, minimalna inhibitorna koncentracija ekstrakta Ros.conh pa 5,60 mg/ml.

Preglednica 16: Povprečne vrednosti minimalnih inhibitornih koncentracij ekstrakta rožmarina za bakterije *Campylobacter* glede na izvor izolata

Oznaka izolata	MIC Ros.con (mg/ml)	MIC Ros.conh (mg/ml)
Živalski izolati	4,00	3,54
Živilski izolati	6,82	5,91
Humani izolati	7,13	5,50

V povprečju je bilo za živalske izolate potrebno 4,0 mg/ml ekstrakta Ros.con in 3,54 mg/ml ekstrakta Ros.conh, za humane izolate je bilo v povprečju potrebno 7,13 mg/ml ekstrakta Ros.con in 5,5 mg/ml ekstrakta Ros.conh, za živilske izolate pa 6,82 mg/ml ekstrakta Ros.con in 5,91 mg/ml ekstrakta Ros.conh (preglednica 16).

Preglednica 17: Povprečne vrednosti minimalnih inhibitornih koncentracij ekstrakta rožmarina za bakterije *Campylobacter* glede na vrsto izolata

		MIC Ros.con (mg/ml)	MIC Ros.conh (mg/ml)
Živalski izolati	<i>C. coli</i>	4,25	4,00
	<i>C. jejuni</i>	2,50	1,25
Živilski izolati	<i>C. coli</i>	5,87	6,36
	<i>C. jejuni</i>	8,04	5,54
Humani izolati	<i>C. coli</i>	8,06	5,00
	<i>C. jejuni</i>	6,36	5,90

Živalski in humani izolati *C. coli* so bili bili v povprečju nekoliko bolj odporni kot *C. jejuni*, saj je bila potrebna večja koncentracija ekstrakta za inhibicijo rasti, izjema so bili živilski izolati, kjer se je pokazalo, da je za inhibicijo rasti bakterij *C. jejuni* potrebno več ekstrakta Ros.con, medtem ko je bilo za inhibicijo rasti *C. coli* potrebno več ekstrakta Ros.conh (preglednica 17). Izračunane razlike niso merodajne, ker je bilo število živalskih sevov zelo majhno.

Preglednica 18: Povprečne vrednosti minimalnih inhibitornih koncentracij ekstraktov Ros.con in Ros.conh za bakterije *Campylobacter* glede na občutljivost (S) oz. odpornost (R) na antibiotik ciprofloksacin

	CIP-R		CIP-S	
	Ros.con (mg/ml)	Ros.conh (mg/ml)	Ros.con (mg/ml)	Ros.conh (mg/ml)
Živalski sevi	2.50	1.25	5.30	4.00
Živilski sevi	5.30	6.50	7.30	5.70
Humani sevi	6.90	7.50	7.20	5.20
Povp.vseh sevov	5,50	6,70	7,00	5,25

Iz preglednice 18 je razvidno, da so povprečne minimalne inhibitorne koncentracije pri bakterijah, ki so odporne na ciprofloksacin, manjše od tistih, ki smo jih ugotovili pri sevih, občutljivih za ciprofloksacin. Povprečne vrednosti MIC ekstrakta Ros.conh pri odpornih sevih, so bile višje kot vrednosti MIC ekstrakta Ros.con, kar je bilo presenetljivo, saj je ekstrakt Ros.conh vseboval večjo koncentracijo karnozolne kisline. Rezultate za živalske seve težko primerjamo z ostalimi, ker je bil le en sev (31/F) odporen na ciprofloksacin, vsi ostali so bili občutljivi. Pri občutljivih sevih je bila povprečna vrednost MIC ekstrakta Ros.con višja kot povprečna vrednost MIC ekstrakta Ros.conh, pri vseh sevih. Pri živilskih sevih, ki so bili občutljivi na ciprofloksacin, je bila povprečna vrednost MIC najvišja. Povprečna vrednost MIC ekstrakta Ros.con je bila v nasprotju s pričakovanji pri sevih, ki so bili občutljivi na antibiotik ciprofloksacin, višja kot pri tistih, ki so nanj odporni.

Preglednica 19: Povprečne vrednosti minimalnih inhibitornih koncentracij ekstraktov Ros.con in Ros.conh za bakterije vrst *C. coli* in *C. jejuni* glede na občutljivost (S) oz. odpornost (R) za/na antibiotik ciprofloksacin

		CIP-R		CIP-S	
		Ros.con (mg/ml)	Ros.conh (mg/ml)	Ros.con (mg/ml)	Ros.conh (mg/ml)
Živalski izolati	<i>C. coli</i>	-	-	4,25	4,00
	<i>C. jejuni</i>	2,50	1,25	-	-
Živilski izolati	<i>C. coli</i>	5,30	7,20	6,20	5,90
	<i>C. jejuni</i>	5,00	5,00	8,65	5,20
Humani izolati	<i>C. coli</i>	6,25	3,75	8,60	5,40
	<i>C. jejuni</i>	7,50	11,25	6,10	4,70

Bakterije vrst *C. coli*, v živilskih izolatih, ki so odporne na antibiotik ciprofloksacin, so tudi bolj odporne na ekstrakt rožmarina, kot bakterije vrst *C. jejuni*. Za inhibicijo bakterij *C. coli*, izolirane iz živil, je bilo potrebno 5,30 mg/ml ekstrakta Ros.con in 7,20 mg/ml ekstrakta Ros.conh. Prav tako so večjo odpornost do ekstrakta rožmarina pokazale tudi bakterije *C. coli* kliničnih izolatov, kjer je bilo za inhibicijo potrebo 6,25 mg/ml Ros.con in 3,75 mg/ml ekstrakta Ros.conh. Pri sevih, ki so bili občutljivi na antibiotik ciprofloksacin, je bila presenetljivo povprečna minimalna inhibitorna koncentracija večja kot pri sevih, ki so bili na antibiotik odporni. Primerjave rezultatov za obe uporabljeni vrsti niso merodajne, saj smo poskus izvedli na relativno majhnem številu izolatov.

Preglednica 20: Povprečne vrednosti minimalnih inhibitornih koncentracij ekstraktov Ros.con in Ros.conh za bakterije *Campylobacter* glede na občutljivost (S) oz. odpornost (R) za / na antibiotik eritromicin

	ERI-R		ERI-S	
	Ros.con (mg/ml)	Ros.conh (mg/ml)	Ros.con (mg/ml)	Ros.conh (mg/ml)
Živalski izolati	2,50	5,00	4,70	3,75
Živilski izolati	5,50	6,50	7,10	5,80
Humani izolati	7,50	7,50	7,00	5,00
Povp.vseh sevov	6,00	6,50	6,80	5,40

Prav tako kot pri sevih, ki so odporni na antibiotik ciprofloksacin (preglednica 18), je bila tudi pri sevih, ki so odporni na antibiotik eritromicin, za inhibicijo rasti potrebna večja ali enaka koncentracija ekstrakta Ros.conh kot ekstrakta Ros.con. Pri primerjavi glede na izvor je bila v povprečju pri odpornih sevih najvišja vrednost MIC pri humanih izolatih, pri sevih, občutljivih na antibiotik eritromicin, pa je bil povprečni MIC največji pri živalskih sevih (preglednica 20). Pri živalskih in živilskih sevih, občutljivih na eritromicin, je bila povprečna vrednost MIC ekstrakta Ros.con presenetljivo višja kot pri sevih, ki so bili na antibiotik odporni (4,70 mg/ml in 7,10 mg/ml), medtem, ko je bila povprečna vrednost MIC ekstrakta Ros.conh pričakovano nižja (3,75 mg/ml in 5,80 mg/ml).

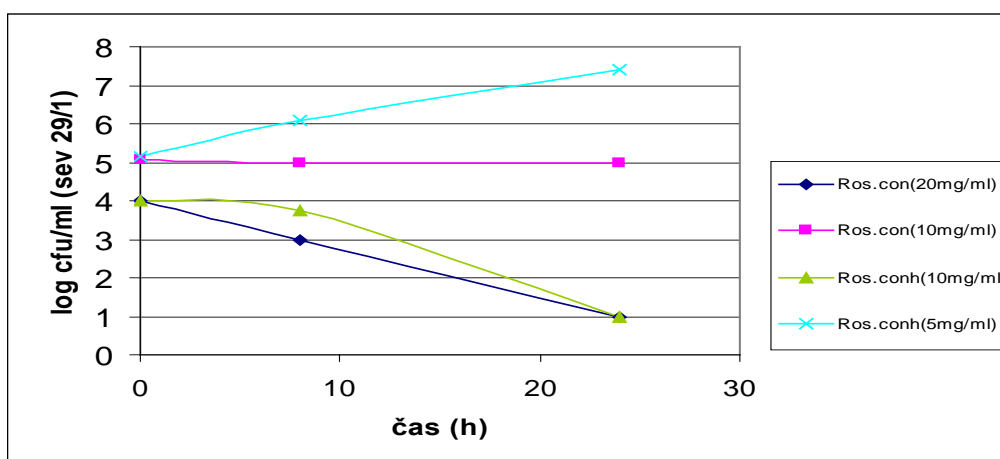
Preglednica 21: Povprečne vrednosti minimalnih inhibitornih koncentracij ekstraktov Ros.con in Ros.conh za bakterije vrst *C. coli* in *C. jejuni* glede na občutljivost (S) oz. odpornost (R) na antibiotik eritromicin

		ERI-R		ERI-S	
		Ros.con (mg/ml)	Ros.conh (mg/ml)	Ros.con (mg/ml)	Ros.conh (mg/ml)
Živalski izolati	<i>C. coli</i>	2,50	5,00	4,70	3,75
	<i>C. jejuni</i>	-	-	-	-
Živilski izolati	<i>C. coli</i>	5,50	6,50	6,00	6,30
	<i>C. jejuni</i>	-	-	8,40	5,20
Humani izolati	<i>C. coli</i>	10,00	5,00	7,80	5,00
	<i>C. jejuni</i>	6,70	8,30	6,25	5,00

Pri opravljenem poskusu smo imeli pri živalskih izolatih le en izolat vrste *C. jejuni*, za katerega nismo imeli podatka o občutljivosti oz. odpornosti na antibiotik eritromicin. Iz vrste *C. coli* je bil le en sev odporen na antibiotik in smo zato težko primerjali med občutljivimi in odpornimi sevi. Pri odpornih in občutljivih sevih na eritromicin, izoliranih iz živil, je bila povprečna vrednost MIC ekstrakta Ros.conh (6,50 mg/ml in 6,30 mg/ml) višja kot povprečna vrednost MIC ekstrakta Ros.con (5,50 mg/ml in 6,00 mg/ml). Pri občutljivih sevih *C. coli* je bila v nasprotju s pričakovanji potrebna večja količina ekstrakta Ros.con (6,00 mg/ml), kot pri sevih, ki so bili odporni na antibiotik (5,50 mg/ml). Pri vrsti *C. jejuni* odpornih živilskih izolatov na antibiotik, je bila povprečna vrednost MIC ekstrakta Ros.con višja (8,40 mg/ml), kot pri odpornih izolatih na eritromicin iz vrste *C. coli* (6,00 mg/ml). Povprečna vrednost MIC ekstrakta Ros.conh je bila pri *C. jejuni* nižja (5,20 mg/ml). Pri humanih izolatih je bilo za primerjavo odpornih sevov na eritromicin glede na vrsto premalo podatkov, saj je bil le en sev *C. coli* odporen na antibiotik. Pri občutljivih sevih na eritromicin iz vrste *C. jejuni* humanih izolatov je bila povprečna vrednost MIC obeh ekstraktov nižja od povprečne vrednosti MIC odpornih izolatov.

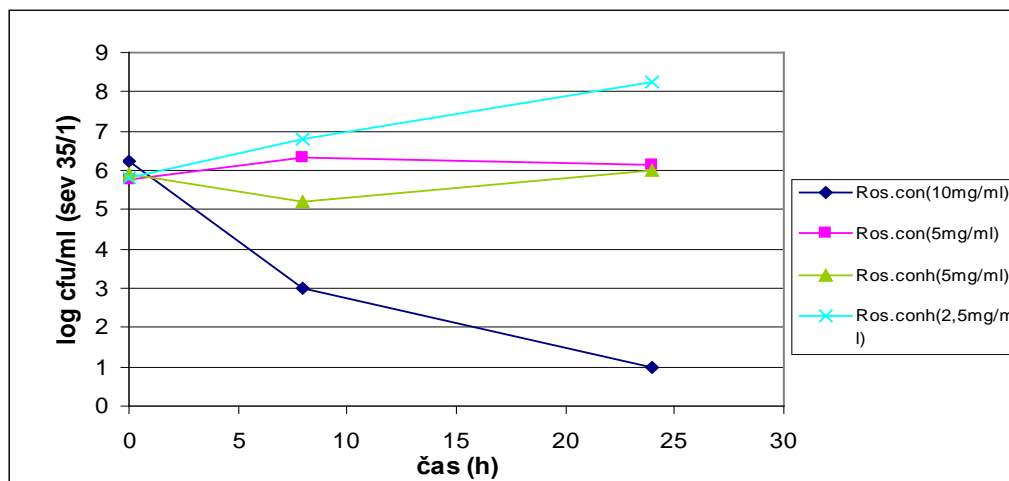
4.4 REZULTATI MAKRODILUCIJSKE METODE V TEKOČEM RASTNEM MEDIJU – UGOTAVLJANJE KINETIKE PROTIMIKROBNEGA DELOVANJA EKSTRAKTOV ROŽMARINA PRI BAKTERIJAH *Campylobacter*

Inhibicijo rasti, bakteriostatično ali celo destruktivno delovanje dodatka ekstrakta v tekočem rastnem gojišču smo opazovali med 24-urno inkubacijo 13 testnih sevov v gojišču Preston in dveh različnih koncentracijah ekstraktov Ros.con in Ros.conh. Koncentracije ekstraktov smo izbrali na osnovi predhodno določenih vrednosti MIC z dilucijsko metodo v agarju.



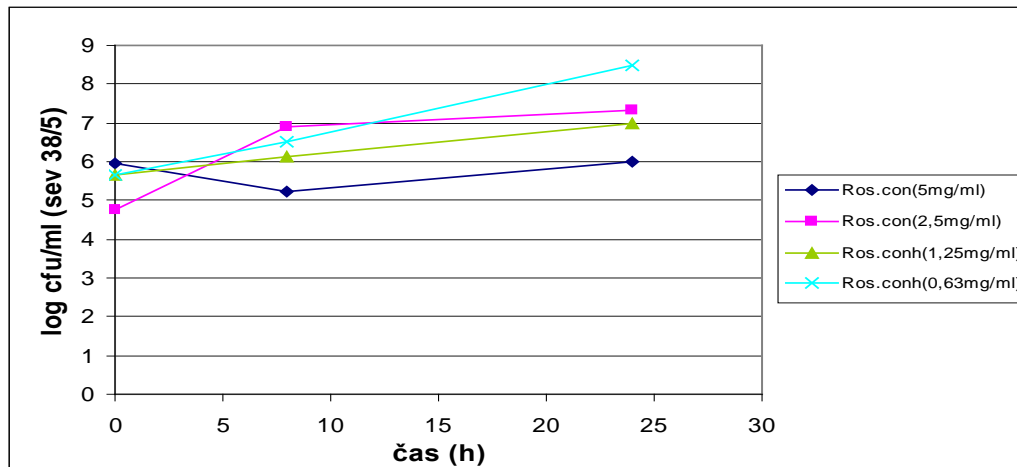
Slika 11: Rastna krivulja in krivulja odmiranja seva *C. jejuni* K29/1 med 24-urno inkubacijo, pri 42 °C, v tekočem gojišču Preston z dodatkom ekstraktov rožmarina

Koncentraciji 10 in 20 mg/ml ekstrakta Ros.conh sta povzročili odmiranje bakterij, koncentracija 10 mg/ml ekstrakta Ros.con pa je tudi zaustavila razmnoževanje bakterij med 24-urno inkubacijo v rastnem mediju, torej je delovala mikrobistatično. Koncentracija 5 mg/ml Ros.conh v gojišču ni preprečila rasti.



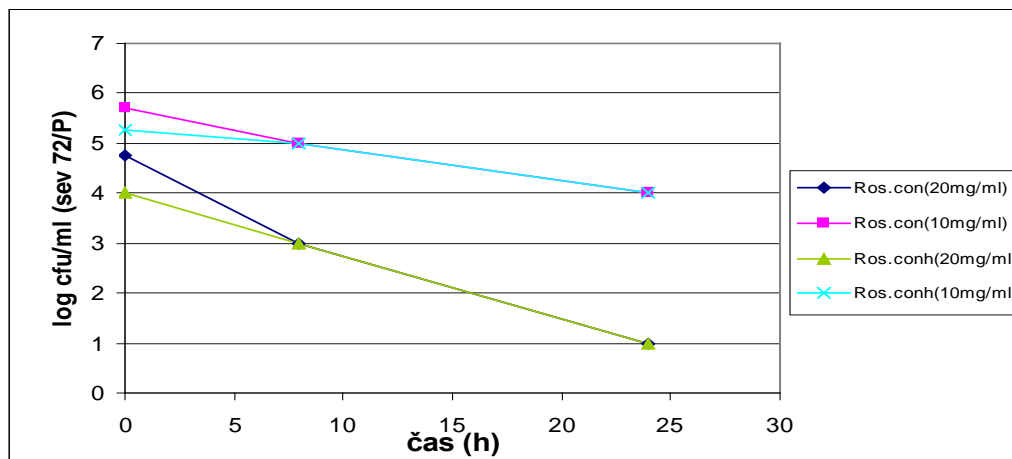
Slika 12: Rastna krivulja in krivulja odmiranja seva *C. jejuni* K35/1 med 24-urno inkubacijo, pri 42 °C, v tekočem gojišču Preston z dodatkom ekstraktov rožmarina

Koncentracija 10 mg/ml ekstrakta Ros.con je delovala destruktivno na sev K35/1 med 24-urno inkubacijo. Koncentraciji 5 mg/ml ekstrakta Ros.con in Ros.conh sta zaustavili razmnoževanje bakterij, medtem ko koncentracija 2,5 mg/ml ekstrakta Ros.conh v gojišču ni preprečila rasti.



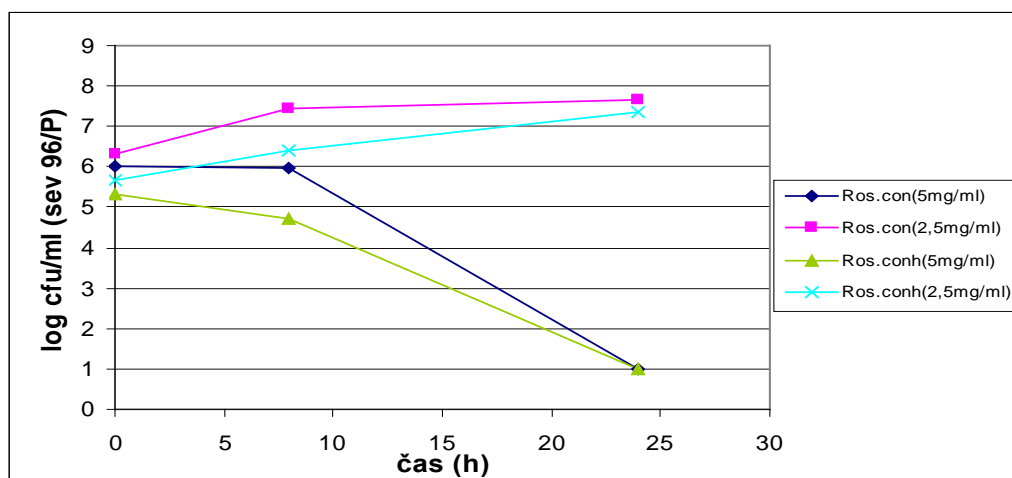
Slika 13: Rastna krivulja in krivulja odmiranja seva *C. coli* K38/5 med 24-urno inkubacijo, pri 42 °C, v tekočem gojišču Preston z dodatkom ekstraktov rožmarina

Koncentracija 5 mg/ml ekstrakta Ros.con je delovala bakteriostatično na bakterije. Uporabljene koncentracije Ros.conh pa so bile premajhne za inhibicijo bakterijske rasti.



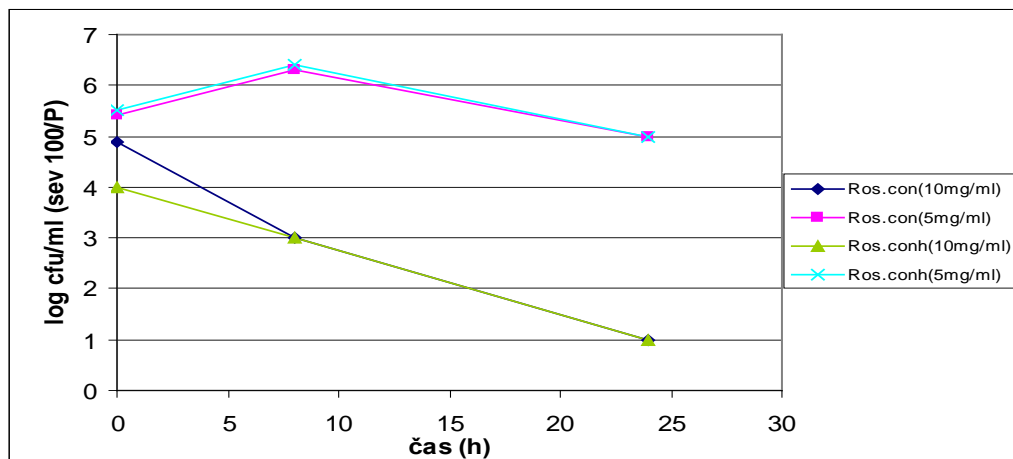
Slika 14: Rastna krivulja in krivulja odmiranja seva *C. coli* 72/P med 24-urno inkubacijo, pri 42 °C, v tekočem gojišču Preston z dodatkom ekstraktov rožmarina

S slike 13 je razvidno, da so vse uporabljene koncentracije ekstraktov delovale destruktivno na sev *C. coli* 72/P. Večja koncentracija obeh ekstraktov je celo povzročila zmanjšanje števila reproduktivnih celic za 3-4 log stopnje.



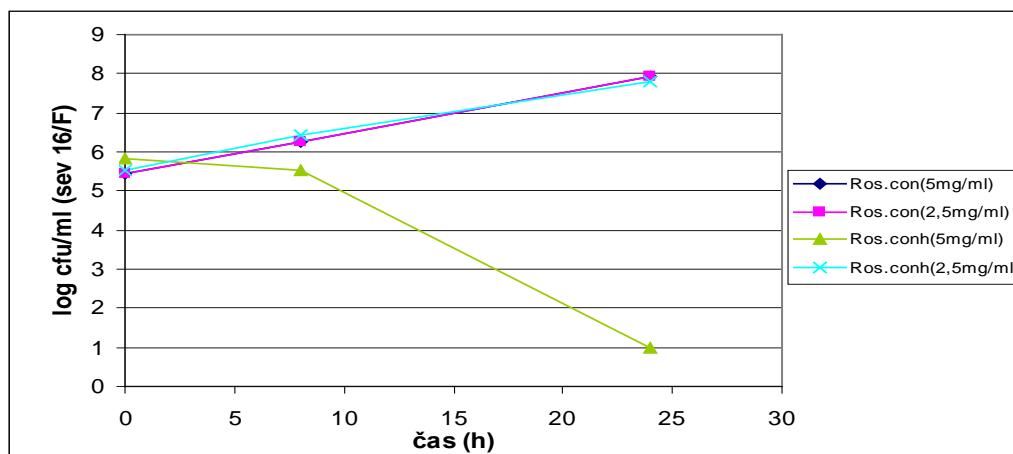
Slika 15: Rastna krivulja in krivulja odmiranja seva *C. jejuni* 96/P med 24-urno inkubacijo, pri 42 °C, v tekočem gojišču Preston z dodatkom ekstraktov rožmarina

Na živalski sev *C. jejuni* 96/P sta destruktivno delovali koncentraciji ekstraktov 5 mg/ml Ros.con in Ros.conh. Koncentracija ekstraktov 2,5 mg/ml ni zaustavila bakterijske rasti.



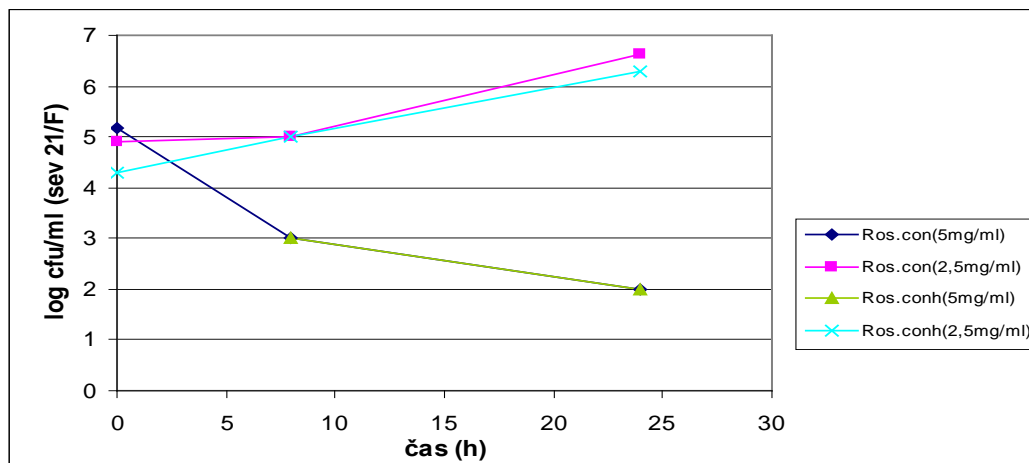
Slika 16: Rastna krivulja in krivulja odmiranja seva *C. coli* 100/P med 24-urno inkubacijo, pri 42 °C, v tekočem gojišču Preston z dodatkom ekstraktov rožmarina

Ekstrakta Ros.con in Ros.conh sta destruktivno delovala na sev *C. coli* 100/P s koncentracijo 10 mg/ml. Bakterijsko rast pa sta ustavili tudi koncentraciji 5 mg/ml obeh ekstraktov.



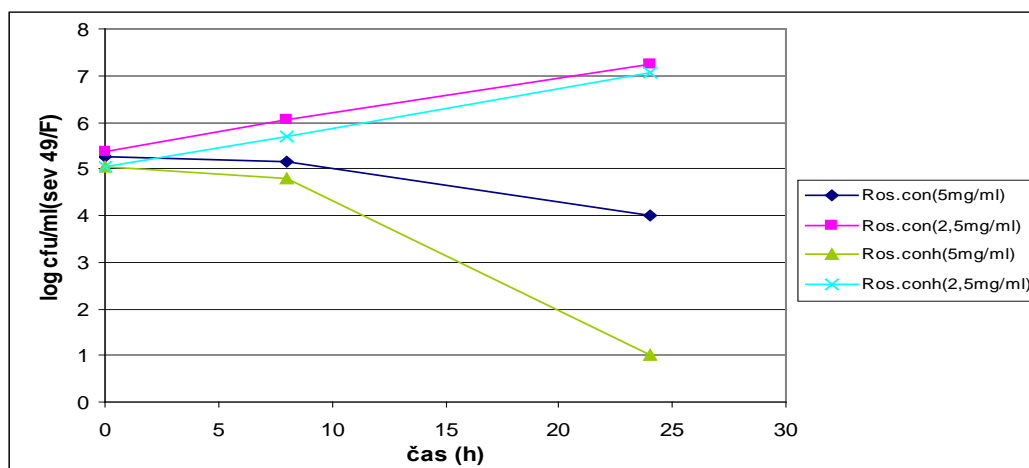
Slika 17: Rastna krivulja in krivulja odmiranja seva *C. coli* 16/F med 24-urno inkubacijo, pri 42 °C, v tekočem gojišču Preston z dodatkom ekstraktov rožmarina

Na sev *C. coli* 16/F je destruktivno deloval le ekstrakt Ros.conh s koncentracijo 5 mg/ml.



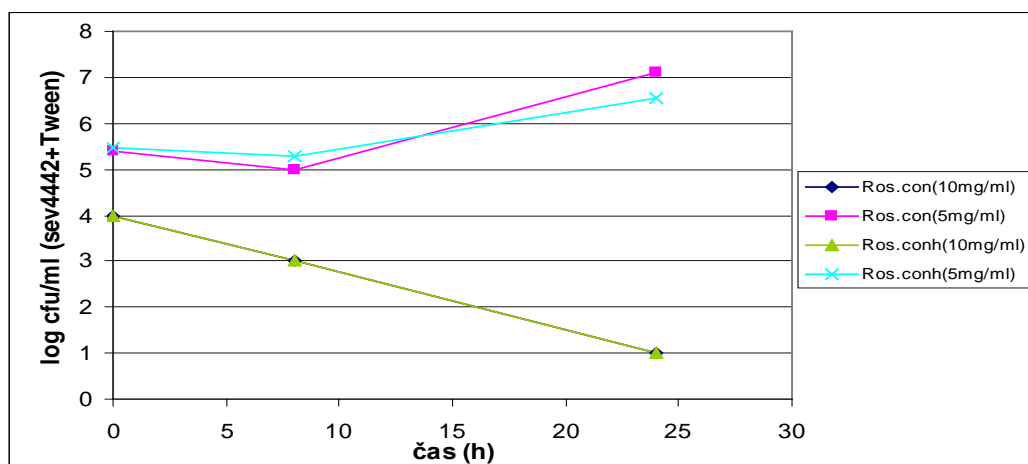
Slika 18: Rastna krivulja in krivulja odmiranja seva *C. coli* 21/F med 24-urno inkubacijo, pri 42 °C, v tekočem gojišču Preston z dodatkom ekstraktov rožmarina

Na sev *C. coli* 21/F sta destruktivno delovali koncentraciji 5 mg/ml ekstrakta Ros.con in Ros.conh, medtem ko je bila uporabljena koncentracija 2,5 mg/ml premajhna za inhibicijo bakterijske rasti.



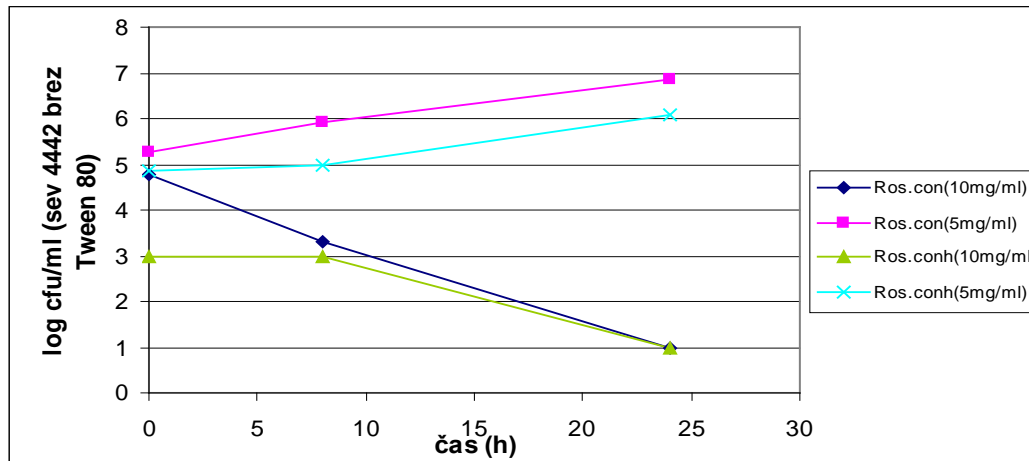
Slika 19: Rastna krivulja in krivulja odmiranja seva *C. coli* 49/F med 24-urno inkubacijo, pri 42 °C, v tekočem gojišču Preston z dodatkom ekstraktov rožmarina

Za sev *C. coli* 49/F sta bili inhibitorni koncentraciji 5mg/ml Ros.con in Ros.conh. Uporabljena koncentracija 2,5 mg/ml ni zaustavila bakterijske rasti.



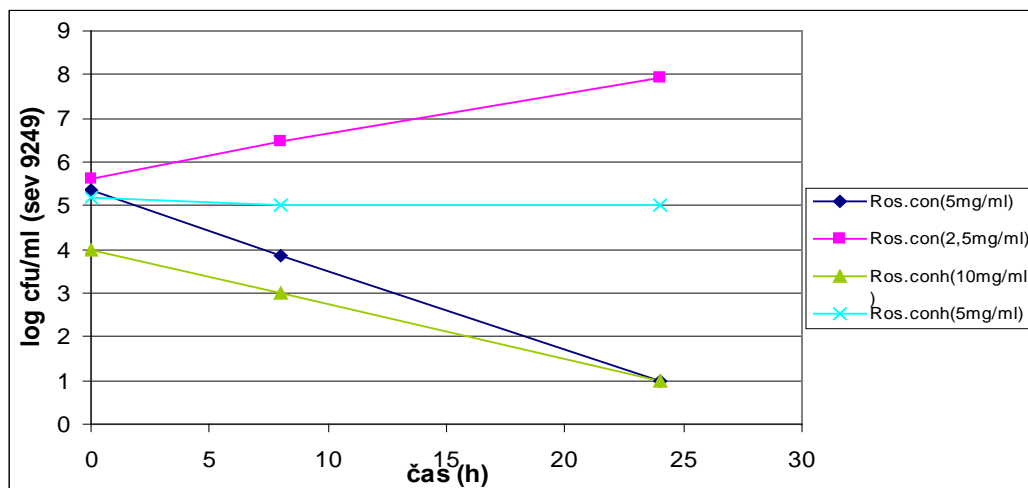
Slika 20: Rastna krivulja in krivulja odmiranja seva *C. coli* 4442+Tween 80 med 24-urno inkubacijo, pri 42 °C, v tekočem gojišču Preston z dodatkom ekstraktov rožmarina

S slike 21 je razvidno, da je kljub dodanemu detergentu Tween 80 na sev *C. coli* 4442 destruktivno delovala le koncentracija 10 mg/ml ekstrakta Ros.con in Ros.conh. 5 mg/ml ekstrakta v rastnem mediju ne vpliva na inhibicijo rasti tega seva bakterij *Campylobacter*.



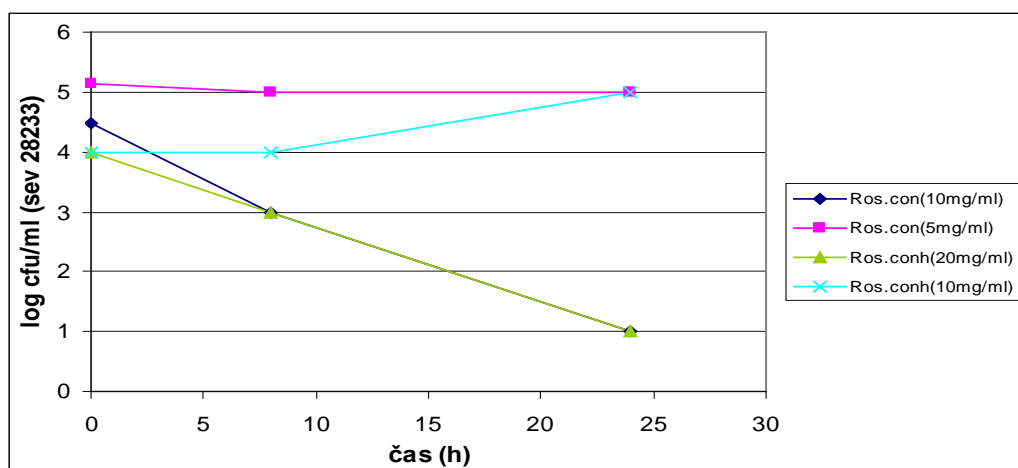
Slika 21: Rastna krivulja in krivulja odmiranja seva *C. coli* 4442 med 24-urno inkubacijo, pri 42 °C, v tekočem gojišču Preston z dodatkom ekstraktov rožmarina

Tako kot pri primeru z dodanim detergentom Tween 80, tudi pri ekstraktu brez dodatka sev *C. coli* 4442 inhibira koncentracija 10 mg/ml ekstrakta Ros.con in Ros.conh. 5 mg/ml ekstrakta v rastnem mediju ne vpliva na inhibicijo rasti tega seva bakterij *Campylobacter*.



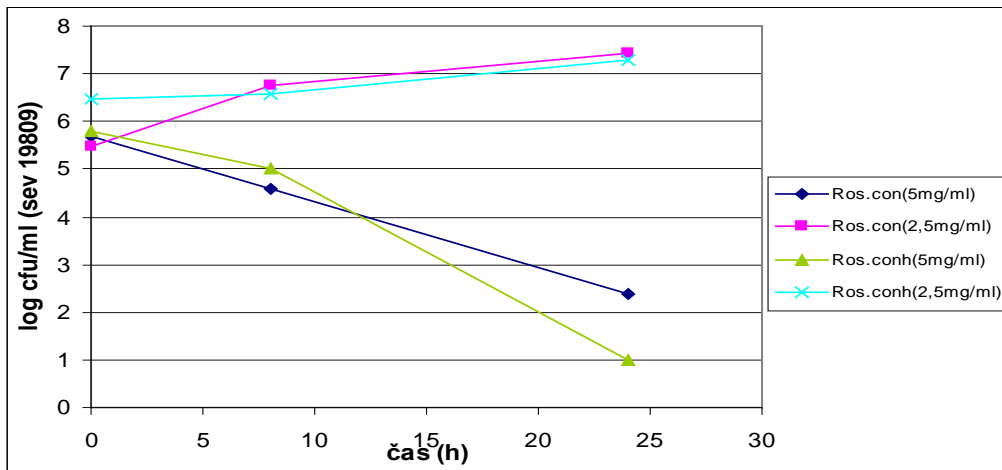
Slika 22: Rastna krivulja in krivulja odmiranja seva *C. coli* 9249 med 24-urno inkubacijo, pri 42 °C, v tekočem gojišču Preston z dodatkom ekstraktov rožmarina

Koncentraciji 10 mg/ml ekstrakta Ros.conh in 5 mg/ml ekstrakta Ros.con sta destruktivno delovali na sev *C. coli* 9249. Koncentracija 5 mg/ml ekstrakta Ros.conh je zaustavila razmnoževanje bakterij. Koncentracija 2,5 mg/ml pa ni delovala inhibitorno na rast bakterij.



Slika 23: Rastna krivulja in krivulja odmiranja seva *C. jejuni* 28233 med 24-urno inkubacijo, pri 42 °C, v tekočem gojišču Preston z dodatkom ekstraktov rožmarina

Pri sevu 28233 sta bili inhibitorni obe poskusni koncentraciji ekstrakta Ros.con, tako 10 mg/ml kot tudi 5 mg/ml, medtem ko pri ekstraktu Ros.conh sev *C. jejuni* 28233 inhibira koncentracija 20 mg/ml.

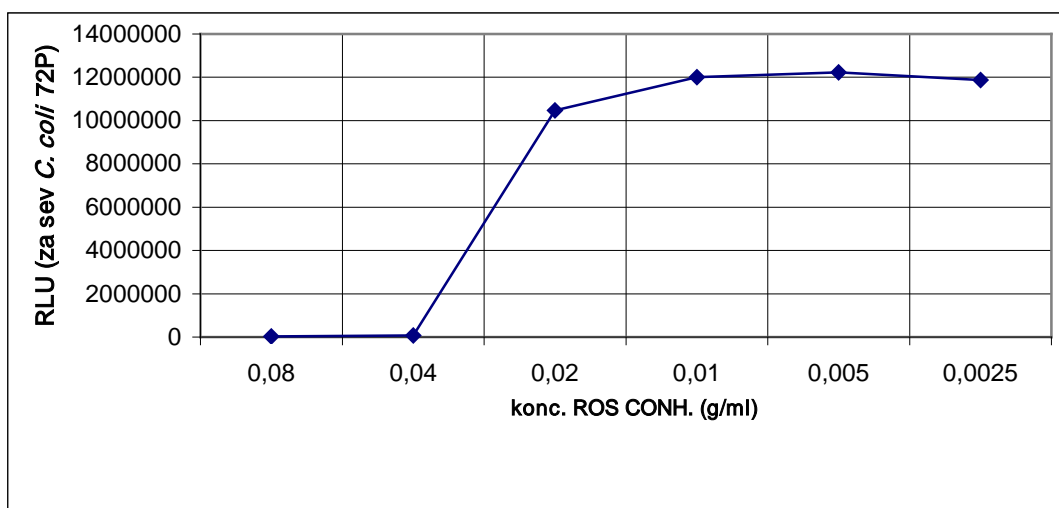


Slika 24: Rastna krivulja in krivulja odmiranja seva *C. jejuni* 19809 med 24-urno inkubacijo, pri 42 °C, v tekočem gojišču Preston z dodatkom ekstraktov rožmarina

Iz slike 24 je razvidno, da sta na sev *C. jejuni* 19809 destruktivno delovali koncentraciji 5 mg/ml ekstrakta Ros.con in Ros.conh.

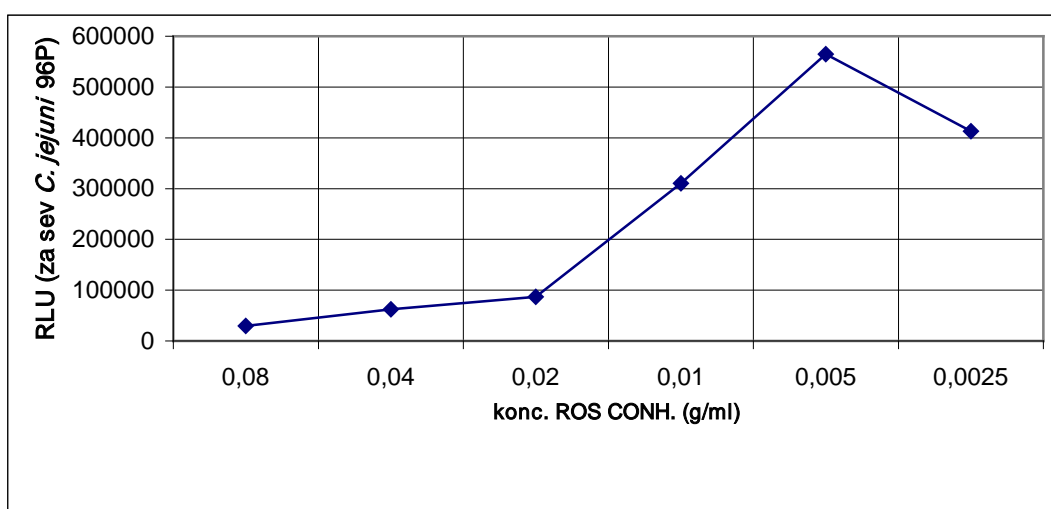
4.5 REZULTATI MIKRODILUCIJSKE METODE V BUJONU

Mikrodilucijsko metodo smo izvedli s šestimi sevi, katere smo uporabili tudi pri metodi makrodilucije. Pri izvajanju metode smo uporabili zgolj ekstrakt Ros.conh. Rezultate smo dobili z merjenjem luminiscence, ki smo jo izrazili v relativnih enotah RLU. Najmanjša koncentracija ekstrakta Ros.conh, ki še daje nizko vrednost RLU, je minimalna inhibitorna koncentracija, ki preprečuje rast testnega seva.



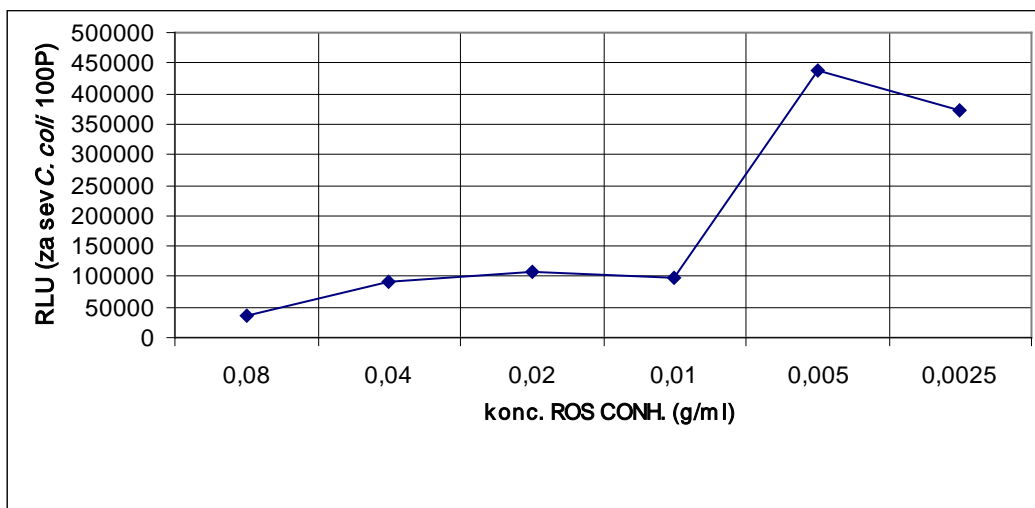
Slika 25: Ugotavljanje minimalne inhibitorne koncentracije ekstrakta Ros.conh za sev *C. coli* 72/P

Z mikrodilucijsko metodo smo določili, da je minimalna inhibitorna koncentracija ekstrakta Ros.conh za sev *C. coli* 72/P 40 mg/ml oz. 0,04 g/ml.



Slika 26: Ugotavljanje minimalne inhibitorne koncentracije ekstrakta Ros.conh za sev *C. jejuni* 96/P

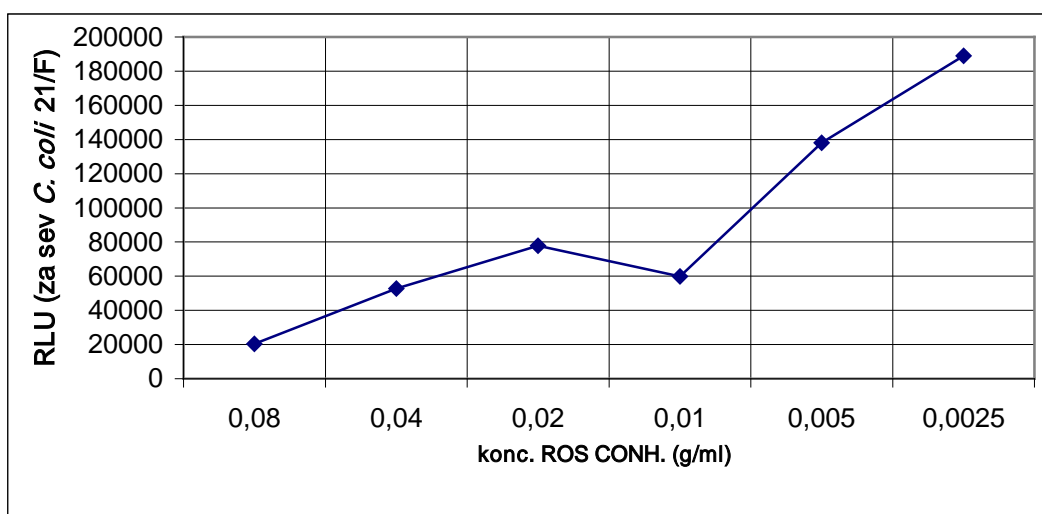
Z mikrodilucijsko metodo smo določili, da je minimalna inhibitorna koncentracija ekstrakta Ros.conh za sev *C. jejuni* 96/P 20 mg/ml oz. 0,02 g/ml, medtem ko so celice pri koncentraciji 5 mg/ml oz. 0,005 g/ml rasle, saj smo izmerili zelo visoko RLU.



Slika 27: Ugotavljanje minimalne inhibitorne koncentracije ekstrakta Ros.conh za sev *C. coli* 100/P

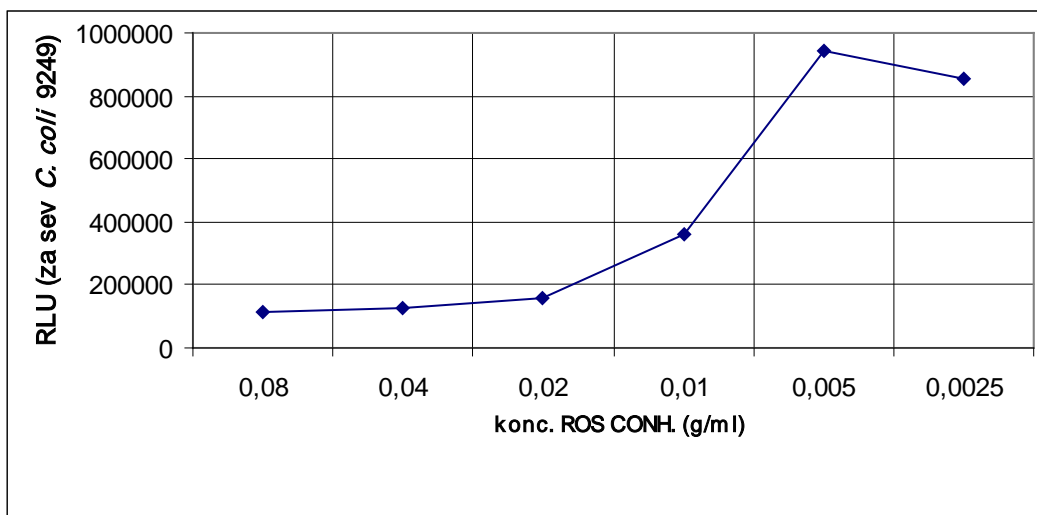
Za sev 100P je bila inhibitorna koncentracija Ros.conh 10 mg/ml oz. 0,01 g/ml, pri mg/ml pa so celice še rasle.

5



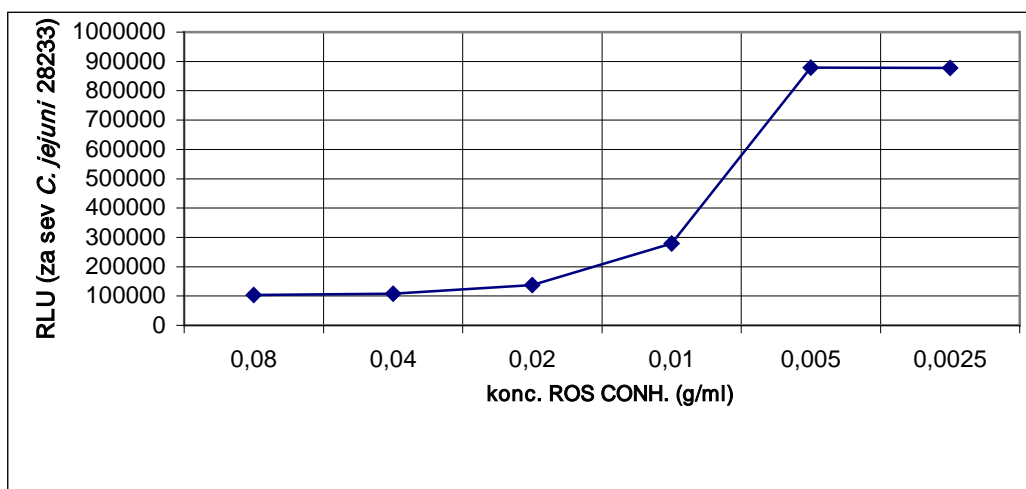
Slika 28: Ugotavljanje minimalne inhibitorne koncentracije ekstrakta Ros.conh za sev *C. coli* 21/F

Razmnoževanje bakterij seva *C. coli* 21/F je zaustavila koncentracija 10 mg/ml ekstrakta Ros.conh.



Slika 29: Ugotavljanje minimalne inhibitorne koncentracije ekstrakta Ros.conh za sev *C. coli* 9249

Vrednost MIC za sev 9249 je bila 0,01 g/ml ekstrakta Ros.conh v rastnem gojišču, ker je bil tam največji preskok v luminiscenci.



Slika 30: Ugotavljanje minimalne inhibitorne koncentracije ekstrakta Ros.conh za sev *C. jejuni* 28233/01

Za sev *C. jejuni* 28233/01 je bila vrednost MIC ekstrakta Ros.conh pri mikrodilucijski metodi 10 mg/ml oz. 0,01 g/ml.

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 RAZPRAVA

V našem poskusu smo preučevali vpliv ekstraktov rožmarina na bakterije rodu *Campylobacter*. Uporabili smo dva komercialna ekstrakta rožmarina, Ros.con in Ros.conh, ki sta vsebovala različno koncentracijo karnozolne kisline.

Fenolne spojine, med katere spada tudi karnozolna kislina, so po raziskavah številnih avtorjev odgovorne spojine za protimikrobno delovanje rožmarina. Moreno in sod. (2006) so karnozolno kislino s HPLC metodo izolirali iz ekstrakta, da bi potrdili njeno protimikrobno delovanje. Njeno aktivnost so preizkusili na bakteriji *S. aureus*. Izolirane spojine so podale podobne vrednosti MIC kot komercialni ekstrakt, na osnovi česar so povzeli, da je karnozolna kislina najodgovornejša komponenta za protimikrobno delovanje ekstrakta rožmarina. Glede na to, da je *S. aureus* po Gramu pozitivna bakterija, nas je zanimalo, če bo imel ekstrakt rožmarina tak vpliv tudi na bakterije rodu *Campylobacter*. Bakterije *Campylobacter* spp. so po Gramu negativne bakterije in zaradi tega manj občutljive na protimikrobna sredstva. Vstop v celico otežuje kompleksna celična ovojnica z lipopolisaharidno zunanjo membrano, ki je po Gramu pozitivne bakterije nimajo.

Uporaba protimikrobnih sredstev v veterinarski in humani medicini, pa tudi kot pospeševalcev rasti v moderni, intenzivni reji živali, namenjenih za prehrano ljudi, je pomembno doprineslo k povečani odpornosti bakterij proti antimikrobnim snovem (Threlfall in sod., 2000). Zaradi tega so za testiranje v kliničnih, veterinarskih in živilskih mikrobioloških laboratorijih razvili različne metode ugotavljanja učinkovitosti protimikrobnih sredstev oz. odpornosti mikroorganizmov nanje. V splošnem lahko te metode razdelimo na difuzijske (difuzijski test v agarju z diski ali komercialna izvedba, kot je E-test) in dilucijske oz. razredčitvene metode (v agarju ali bujonu, makro ali mikrodilucijska metoda). Pri vseh omenjenih metodah določimo eno vrednost, običajno MIC, ki je inhibirala oz. zaustavila rast bakterij. Poleg tega poznamo še metode, ki omogočajo opazovanje protimikrobnega učinka v daljšem časovnem obdobju, kar pomeni, da podajajo določeno informacijo o načinu oz. dinamiki protimikrobnega delovanja (Lopez-Malo Vigil in sod. 2005).

V eksperimentalnem delu naloge smo uporabili ekstrakt rožmarina Ros.con, ki je vseboval 22,04 % karnozolne kisline in Ros.conh, ki je vseboval 40,49 % karnozolne kisline ter izolate bakterij *C. coli* in *C. jejuni* iz živil, živali in humanih kliničnih vzorcev. Preučevali smo protimikrobno učinkovitost ekstraktov rožmarina in morebitne zveze med učinkovitostjo ekstrakta in odpornostjo izolatov proti nekaterim antibiotikom.

Predpostavljali smo, da bodo imeli ekstrakti rožmarina inhibitoren učinek na bakterije *C. coli* in *C. jejuni*, vendar pa nismo mogli predpostaviti koncentracije, ki bi zaustavila rast in razmnoževanje teh bakterij. Poskus smo opravili s štirimi različnimi *in vitro* metodami ugotavljanja bakterijske občutljivosti, in sicer: metodo difuzije v agarju z luknjicami, dilucijsko metodo v agarju ter makro in mikrodilucijsko metodo v tekočem hranilnem mediju.

5.1.1 Metoda difuzije v agarju z luknjicami

Difuzijska metoda se rutinsko zelo veliko uporablja, ker je relativno enostavna. Za testiranje aktivnosti novih protimikrobnih snovi se lahko uporablja kot presejalna («screening») metoda. Še posebej je uporabna pri preverjanju velikega števila izolatov, torej pri določanju protimikrobnega spektra novih protimikrobnih sredstev (Dorman in Deans, 2000).

Iz preglednice 14 je razvidno, da je bila za inhibicijo bakterij potrebna večja koncentracija ekstrakta Ros.con, ki vsebuje manjši odstotek karnozolne kisline. Na podlagi tega lahko sklepamo, da je karnozolna kislina tista fenolna spojina, ki je imela največji vpliv na inhibicijo rasti, saj jo ekstrakt Ros.conh vsebuje 40,49 % in je bila za inhibicijo potrebna manjša koncentracija. Vrednosti MIC za oba ekstrakta so znašale od 12,5 mg/ml do 100 mg/ml, tako pri bakteriji *C. coli* kot tudi pri *C. jejuni*. Iz tega lahko sklepamo, da bistvene razlike v odpornosti uporabljenih sevov med *C. coli* in *C. jejuni* ni bilo, saj sta bili povprečni inhibitorni koncentraciji za obe vrsti bakterij prav tako približno enaki. Razlog velikih inhibitornih koncentracij v primerjavi s tistimi, ki so jih določili za ekstrakte istega tipa pri drugih, predvsem po Gramu pozitivnih vrstah, lahko pripišemo po Gramu negativni zunanji membrani, ki omeji difuzijo hidrofobnih komponent v notranjost celice (Burt, 2004) ali pa v obrambnem mehanizmu celice. Med drugim pa je lahko razlog tudi v načinu ekstrakcije oz. pridobivanju ekstrakta, ki je težje difundiral v agar. To je tudi ena od največjih omejitev te sicer enostavne metode ugotavljanja občutljivosti bakterijskih sevov.

5.1.2 Dilucijska metoda v agarju

Dilucijska metoda v agarju je sprejeta kot standardna metoda za določanje minimalne inhibitorne koncentracije pri bakterijah *Campylobacter* spp, zato smo pri tej metodi uporabili največje število izolatov.

Ugotovili smo, da je bila povprečna vrednost MIC ekstrakta Ros.con 6,65 mg/ml, medtem, ko je bila povprečna vrednost MIC ekstrakta Ros.conh 5,60 mg/ml. Tako je iz preglednice 16 razvidno, da je povprečna vrednost MIC vseh skupin izolatov glede na njihov izvor višja pri ekstraktu Ros.con (4,0 mg/ml, 6,82 mg/ml in 7,13 mg/ml), kot pri ekstraktu Ros.conh (3,54 mg/ml, 5,91 mg/ml in 5,5 mg/ml). To je razumljivo, saj je Ros.conh vseboval dvakratno koncentracijo glavne protimikrobne učinkovine – karnozolne kisline. Da razlike povprečnih vrednosti MIC niso še večje, verjetno botruje dejstvo, da so tudi ostale komponente ekstrakta, ki verjetno prav tako spadajo med fenolne spojine, protimikrobno aktivne. Možno je tudi sinergistično delovanje.

Sevi vrste *C. coli* so bili v povprečju bolj odporni proti ekstraktu rožmarina kot sevi *C. jejuni*. To smo tudi pričakovali, saj je za vrsto *C. coli* značilno, da so bolj pogosto odporni tudi proti antibiotikom.

Pri dilucijski metodi v agarju smo ugotavljali tudi morebitno povezavo med učinkovitostjo uporabljenega ekstrakta in odpornostjo uporabljenih sevov proti antibiotikoma ciprofloksacin in eritromicin. Za seve, katere smo uporabili v eksperimentu, so na Biotehniški fakulteti v Ljubljani in na Zavodu za zdravstveno varstvo Nova Gorica že določili odpornost proti ciprofloksacinu in eritromicinu. Tako smo iskali morebitno zvezo med vrednostmi MIC sevov, ki so bili odporni na eritromicin in ciprofloksacin in tistimi, ki so bili za te antibiotike občutljivi. Rezultati so pokazali, da je bilo za tiste seve, ki so odporni na ciprofloksacin, za inhibicijo potrebno dodati v povprečju 6,6 mg/ml ekstrakta Ros.con in 5,00 mg/ml Ros.conh,

medtem ko je bilo potrebno za inhibicijo tistih sevov, ki so nanj občutljivi potrebno 4,90 mg/ml Ros.con in 5,10 mg/ml Ros.conh ekstrakta. Za seve, ki so odporni na antibiotik eritromicin, je bilo za inhibicijo potrebno dodati 5,20 mg/ml ekstrakta Ros.con in 5,10 mg/ml ekstrakta Ros.conh, za seve, ki so na eritromicin občutljivi pa je bila povprečna vrednost MIC 6,30 mg/ml ekstrakta Ros.con in 4,85 mg/ml ekstrakta Ros.conh. Pri preučevanju morebitne povezave med odpornostjo oz. občutljivostjo do antibiotikov in do protimikrobnega delovanja rožmarina torej nismo ugotovili direktne povezave.

Pri izolatih, izoliranih iz živali in živil, je ugotavljanje odpornosti sevov *C. coli* in *C. jejuni* proti antibiotikom pokazalo na visok delež (23 %) zelo odpornih izolatov proti ciprofloksacinu (MIC > 32 µg/ml) in zmeren delež (12 %) zelo odpornih izolatov (MIC > 256 µg/ml) proti eritromicinu. Delež odpornosti je bil večji pri izolatih vrste *C. coli* (80 %), kot pri *C. jejuni* (26 %), kar je pomembno zaradi visoke zastopanosti *C. coli* v slovenskem prostoru (Zorman in Smole Možina, 2002).

Rezultati nakazujejo, da celice uporabljajo različne obrambne mehanizme in da v našem primeru uporabljajo za izločevanje antibiotikov drug način kot za obrambo pred rastlinskimi ekstrakti. Številne raziskave so pokazale, da so vzrok odpornosti bakterij *Campylobacter* proti kinolonom in makrolidom mutacije v genih GyrA podenote giraze in 23S rRNA. K odpornosti prispevajo tudi membranske izlivne črpalke, ki so možen razlog večkratne odpornosti sevov na različna protimikrobna sredstva (Kurinčič in sod. 2006).

5.1.3 Primerjava rezultatov difuzijske in dilucijske metode v agarju

Medsebojno smo primerjali minimalne inhibitorne koncentracije obeh ekstraktov pri določenih sevih. Vrednosti MIC so se gibale od 12,5 mg/ml do 100 mg/ml, če so smo uporabili difuzijsko metodo. Z rezultati dilucijske metode niso bili skladni, saj so bile tam koncentracije MIC med 1,25 mg/ml in 20 mg/ml. Razlog za to je lahko slaba difuzija ekstrakta skozi agar zaradi prevelike granulacije. Čeprav je bil v našem poskusu rožmarinski ekstrakt v obeh primerih (Ros.con in Ros.conh) dobro topen v absolutnem etanolu, smo pri večjih koncentracijah po inkubaciji opazili usedlino na dnu luknjic. Na podlagi tega bi lahko sklepali, da ni dobro difundiral skozi agar in je zato najmanjša koncentracija, ki je povzročila inhibicijo bakterijske rasti, večja kot pri drugih metodah.

5.1.4 Kinetika protimikrobnega delovanja ekstraktov rožmarina pri bakterijah *Campylobacter*

Krivulje inhibicije ali celo odmiranja se pogosto uporabljajo za ovrednotenje protimikrobnega delovanja sredstev proti bakterijam, kvasovkam, plesnim. Ker podajajo rezultate večjega števila vzorčenj, so bolj informativne kot rezultati metod s končno točko merjenja. Meritve koncentracije mikrobnih celic smo izvedli v neselektivnem bujonu, v katerega smo dodali protimikrobno sredstvo v določeni koncentraciji in inokulum testnega mikroorganizma. Inkubacija je potekala pri optimalni temperaturi 24 ur. Metoda je mnogostransko uporabna, vendar ima kljub vsemu tudi svoje slabosti. Zahteva veliko dela in stroškov.

Koncentracije protimikrobnega sredstva v tem delu eksperimentov smo izbrali na osnovi rezultatov dilucijske metode v agarju. Uporabili smo dve različni koncentraciji v območju vrednosti MIC, določene z dilucijsko metodo v agarju. Ugotovili smo, da je v večini primerov

krivulja odmiranja odražala baktericidno delovanje uporabljene večje koncentracije, pri manjši pa so se bakterije razmnoževale še naprej. Zanimiv je primer, ko je bila vrednost MIC pri dilucijski metodi v agarju višja, vendar je bila manjša koncentracija v bujonu vseeno inhibitorna za ta sev. Pri sevu 72 P je bila vrednost MIC ekstrakta Ros.con pri agar dilucijski metodi 20 mg/ml, pri makrodilucijski metodi v agarju smo zato testirali koncentraciji 2 % in 1 % raztopino ekstrakta in ugotovili, da je bila tudi 1 % koncentracija ekstrakta inhibitorna za sev. S to metodo smo pri večini primerov potrdili točnost in zanesljivost dilucijske metode v agarju, saj se je v večini primerov izkazalo, da so bile ravno vrednosti MIC te metode inhibitorne za seve tudi pri makrodilucijski metodi.

5.1.5 Mikrodilucijska metoda v bujonu

Mikrodilucijska metoda v bujonu je tehnično lahko izvedljiva in je lahko tudi avtomatizirana, zahteva pa opremljenost laboratorijev z mikrotiterskim čitalcem plošč. Uporabljali so jo predvsem pri testiranju občutljivosti kampilobakterjev proti antibiotikom (Luber in sod., 2003). V naši nalogi smo jo izvedli z namenom, da bi jo primerjali z metodama dilucije v agarju in makrodilucijsko metodo. Uporabili smo 6 sevov, ki so bili uporabljeni tudi pri ostalih metodah. Metodo mikrodilucije v bujonu smo opravili le z ekstraktom Ros.conh.

Rezultati vrednosti MIC, ki smo jih dobili pri tej metodi, so bili v primerjavi z ostalimi metodami višji. Pri izolatu 72 P, je bila vrednost MIC 40 mg/ml, medtem ko je bila pri dilucijski metodi v agarju 20 mg/ml, pri makrodilucijski metodi pa 10 mg/ml. Izolat 96P je bil inhibiran pri koncentraciji 20 mg/ml, medtem ko je bilo pri drugih dveh metodah za inhibicijo potrebno le 5 mg/ml ekstrakta Ros.conh v gojišču. Pri izolatu 9249 je bila razlika največja, saj je bila vrednost MIC pri mikrodiluciji 20 mg/ml, pri agar dilucijski metodi 2,5 mg/ml, pri makrodilucijski pa 5 mg/ml ekstrakta v gojišču. Pri ostalih treh sevih z oznakami 21 F, 100 P in 28233 so bili rezultati za vrednosti MIC praktično enaki. Čeprav smo v analizo protimikrobne učinkovitosti ekstraktov z mikrodilucijsko metodo vključili le majhno število sevov, lahko glede na rezultate sklepamo, da se vrednosti MIC ujemajo približno v polovici analiziranih primerov. Lahko govorimo le o indikaciji, da mikrodilucijska metoda daje nekoliko višje vrednosti minimalne inhibitorne koncentracije kot merila protimikrobne učinkovitosti. To domnevo bi bilo potrebno preučiti na bistveno večjem številu sevov. Poleg tega pa je razlog razlike tudi nekoliko drugačna sestava medija, ki je bila uporabljena za optimalno rast v tekočem in trdnem gojišču. Literarnih podatkov o tem za učinkovitost naravnih protimikrobnih snovi, kot so rastlinski ekstrakti, nismo našli, obstaja pa nekaj publikacij o podobnem problemu pri testiranju odpornosti kampilobakterjev proti antibiotikom (Luber in sod. 2003; Halbert in sod., 2005; McDermott in sod. 2005). Luber in sod. (2003) so pri svoji raziskavi o občutljivosti kampilobakterjev na nekatere antibiotke prišli do ugotovitve, da so rezultati mikrodilucijske metode višji od rezultatov ostalih metod, ki so jih še opravili.

Halbert in sod. (2005) poročajo o 79,7, 82,1 in 86,7 % ujemanju rezultatov pri testiranju odpornosti proti eritromicinu, ampicilinu in ciprofloksacinu s standardno dilucijsko metodo v agarju in mikrodilucijsko metodo. Slednjo pač priporočajo kot sprejemljivo alternativo dražji in zahtevnejši dilucijski metodi v agarju.

5.2 SKLEPI

- Potrdili smo protimikrobno delovanje preiskovanih ekstraktov rožmarina na bakterije *C. coli* in *C. jejuni* v *in vitro* poskusu. Bolj učinkovit je bil ekstrakt z večjo vsebnostjo karnozolne kisline, ki je glede na literaturne podatke glavni nosilec protimikrobne učinkovitosti tovrstnih ekstraktov. Razlike v ugotovljenih minimalnih inhibitornih koncentracijah (MIC) pa so bile majhne, zato sklepamo, da k učinkovitosti prispevajo tudi ostale (fenolne) sestavine ekstraktov.
- Vrednosti MIC, pridobljene z različnimi metodami ugotavljanja protimikrobne učinkovitosti, se med seboj razlikujejo.
- Ker smo s standardno dilucijsko metodo v agarju uporabili največje število sevov (63 sevov bakterij *C. jejuni* in *C. coli* živalskega, živilskega ali humanega izvora), podajamo vrednosti MIC te metode in znašajo v povprečju 6,65 mg/ml pripravka Ros.con in 5,60 mg/ml pripravka Ros.conh v gojišču. Te vrednosti smo pri večini preizkušenih sevov potrdili tudi z makrodilucijsko metodo v bujonu, kjer smo lahko dodatno razlikovali tudi bakteriostatično in baktericidno delovanje določene koncentracije protimikrobnega ekstrakta med 24-urno inkubacijo v tekočem gojišču.
- Z mikrodilucijsko metodo, ki smo jo uporabili na manjšem številu sevov in z gojiščem Preston, smo izmerili višje vrednosti MIC ekstrakta Ros.conh kot pri ostalih metodah, kar bi bilo potrebno nadalje preučiti z večjim številom sevov.
- Pri preučevanju morebitne povezave med odpornostjo sevov proti antibiotikoma ciprofloksacin in eritromicin ter odpornostjo proti delovanju ekstraktov rožmarina nismo ugotovili direktne povezave.

6 POVZETEK

Zaradi zahtev potrošnikov se v zadnjem obdobju pojavlja vedno večje zanimanje za naravne in multifunkcionalne aditive k hrani. Kupci dajejo prednost živilom brez kemijskih konzervansov, z manjšo koncentracijo soli in sladkorja ter brez radikalnih načinov konzerviranja. Ena od možnosti je uporaba naravnih rastlinskih aditivov, ki imajo lahko antioksidativne in protimikrobne značilnosti. Med njih sodijo tudi ekstrakti rožmarina.

Rožmarin je rastlina, ki se lahko uporablja kot zelišče ali začimba, v kozmetiki, farmaciji, medicini in v živilstvu. Rožmarin je znan kot vir določenih polifenolnih spojin, ki so odgovorne za njegovo antioksidativno in protimikrobno delovanje. Najbolj pomembne sestavine za tovrstno delovanje so po ugotovitvah Morena in sod. (2006) karnozolna kislina, karnozol, kavna kislina in njen derivat, rožmarinska kislina.

Bakterije rodu *Campylobacter* so patogene bakterije, ki povzročajo črevesna obolenja. Izvirajo iz živali, namenjenih za prehrano človeka, okužena perutnina pa je najbolj pogost vir bakterij *Campylobacter* spp. Bakterije *Campylobacter* spp. so po Gramu negativne bakterije in zaradi tega manj občutljive za protimikrobna sredstva (Friedman in sod., 2002).

V diplomski nalogi smo ugotavljali protimikrobno aktivnost ekstraktov rožmarina na bakterije *Campylobacter* s štirimi različnimi metodami. Najprej smo uporabili difuzijsko metodo v agarju z luknjicami, nato pa standardno dilucijsko metodo v agarju. V tekočem gojišču smo učinkovitost testirali z makrodilucijsko in mikrodilucijsko metodo. Želeli smo izbrati optimalno metodo in jo uporabiti za določitev minimalne inhibitorne koncentracije ekstraktov rožmarina, ki inhibirajo rast različnih sevov bakterij *Campylobacter*. Kot testne mikroorganizme smo skupno uporabili 63 sevov bakterij *C. jejuni* in *C. coli* živalskega, živilskega in humanega izvora. Uporabljeni sevi iz zbirke Katedre za živilsko mikrobiologijo so že imeli zbrane podatke o odpornosti sevov proti nekaterim antibiotikom. Namen dela je bil preučiti tudi morebitno zvezo med odpornostjo proti antibiotikoma ciprofloksacin in eritromicin ter rastlinskim ekstraktom. Obstaja namreč možnost, da so v razvoj odpornosti proti različnim protimikrobnim snovem vključeni sorodni mehanizmi (izlivne črpalke v membrani bakterijski celice).

V eksperimentalnem delu smo uporabili dva ekstrakta rožmarina z različno vsebnostjo karnozolne kisline. Pripravek Ros.con je vseboval 22,04 % karnozolne kisline, Ros.conh pa 40,49 % karnozolne kisline. Celice testnih kultur smo pripravili v tekočem gojišču Preston. Koncentracije ekstraktov smo pripravili glede na preučevano metodo. Z difuzijsko metodo v agarju, ki je izvedbeno najenostavnejša in smo jo uporabili najprej, smo testirali najširše območje koncentracij, pri ostalih metodah pa smo upoštevali rezultate prejšnjih metod. Pri vseh metodah smo kulturo inkubirali na trdnem ali v tekočem gojišču Mueller Hinton ali Preston, 24 do 48 ur pri 42°C. Po inkubaciji smo odčitali rast bakterij. Kot vrednost MIC smo šteli tisto koncentracijo, pri kateri ni bilo vidne rasti bakterij na oz. v gojišču.

Ugotovili smo, da so rezultati difuzijske in dilucijske metode v agarju težko primerljivi. Pri difuzijski metodi so že za minimalno inhibicijsko cono potrebne večje koncentracije obeh ekstraktov v gojišču kot pri dilucijski metodi. Predvidevamo, da je vzrok za to slaba difuzija agensa v agarju. Makrodilucijska metoda v bujonu je v večini primerov potrdila minimalne inhibitorne koncentracije dilucijske metode v agarju. S slednjo smo pri 63 sevih določili

vrednost MIC v območju od 1,25 mg/ml do 20 mg/ml ekstraktov Ros.con in Ros.conh v gojišču, v povprečju vrednost 6,65 mg/ml pripravka Ros.con in 5,60 mg/ml pripravka Ros.conh v rastnem mediju. Z mikrodilucijsko metodo, ki smo jo uporabili na manjšem številu sevov, smo izmerili višje vrednosti MIC, kar bi bilo potrebno nadalje preučiti. Pri preučevanju morebitne povezave med odpornostjo sevov proti antibiotikoma ciprofloksacin in eritromicin ter odpornostjo proti delovanju ekstrakta rožmarina nismo ugotovili direktne povezave.

7 VIRI

- Aarestrup F.M., Engberg J. 2001. Antimicrobial resistance of thermophilic *Campylobacter*. *Veterinary Research*, 32: 311-321
- Albu S., Joyce E., Paniwnyk L., Lorimer J.P., Mason T.J. 2004. Potential for the use of ultrasound in the extraction of antioxidants from *Rosmarinus officinalis* for the food and pharmaceutical industry. *Ultrasonics Sonochemistry*, 11: 261-265
- Almela L., Sanchez-Munoz B., Fernandez-Lopez J. A., Roca M., Rabe V. 2006. Liquid chromatographic–mass spectrometric analysis of phenolics and free radical scavenging activity of rosemary extracts from different raw material. *Journal Chromatography A*, 1120: 221-229
- Andlovic A. 2002. Kampilobakterji. V: *Medicinska bakteriologija z imunologijo in mikologijo*. Gubina M., Ihan A. (ur.). Ljubljana, Medicinski razgledi: 217-224
- Angioni A., Barra A., Cereti E., Barile D., Coisson J. D., Arlorio M., Dessi S., Coroneo V., Cabras P. 2004. Chemical composition, plant genetic differences, antimicrobial and antifungal activity investigation of the essential oil of *Rosmarinus officinalis* L. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52: 3530-3535
- Araujo C., Sousa M.J., Ferreira M.F., Leao C. 2003. Activity of essential oils from mediterranean *Lamiceae* species against food spoilage yeasts. *Journal of Food Protection*, 4: 625-632
- Avrain L., Humbert F., L'Hospitalier R., Sanders P., Vernozy-Rozand C., Kempf I. 2003. Antimicrobial resistance in *Campylobacter* from broilers: association with production type and antimicrobial use. *Veterinary Microbiology*, 96: 267-276
- Berce I., Sarjanović L., Smole Možina S. 2004. Naraščajoča odpornost proti antibiotikom pri mikroorganizmih v prehranski verigi. V: *Mikrobiologija in biotehnologija v proizvodnji varnih živil*. Raspor P. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 111-129
- Branen A.L., Davidson P.M., Katz B. 1980. Antimicrobial properties of phenolic antioxidants and lipids. *Food Technology*, 34: 42-42
- Burt S. 2004. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods – a review. *International Journal of Food Microbiology*, 94: 223-253
- Butzler J.P. 2004. *Campylobacter*, from obscurity to celebrity. *Clinical Microbiology and Infection*, 10: 865-876

Carvalho R.N., Moura L.S., Rosa P.T.V., Meireles M.A.A. 2005. Supercritical fluid extraction from rosemary (*Rosmarinus officinalis*): Kinetic data, extract's global yield, composition, and antioxidant activity. *Journal of Supercritical Fluids*, 35: 197-204

Campylobacter. 2006. Houston, Medical Education Information Center.
<http://medic.med.uth.tmc.edu/path/00001494.htm> (07.01.2006): 1 str.

Canillac N., Mourey A. 2001. Antibacterial activity of the essential oil of *Picea excelsa* on *Listeria*, *Staphylococcus aureus* and coliform bacteria. *Food Microbiology*, 18: 261-268

Carson C.F., Cookson B.D., Farrelly H.D., Riley T.V. 1995. Susceptibility of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* to the essential oil of *Melaleuca alternifolia*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 35: 421-424

Cloete T.E. 2003. Resistance mechanisms of bacteria to antimicrobial compounds. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 51: 277-282

Cowan M.M. 1999. Plant products as antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews*, 4: 564-582

Cuvelier M.E., Richard H., Berset C. 1996. Antioxidative activity and phenolic composition of pilot-plant and commercial extracts of sage and rosemary. *Journal of the American Oil Chemists Society* 73: 645-652

Davidson P.M., Branen A.L. 2005. Food antimicrobials - an introduction. V: Antimicrobials in food. 3rd ed. Davidson P.M., Sofos J.N. in Branen A.L. (eds.). Boca Raton, Taylor&Francis Group: 1-10

Delaquis P.J., Stanich K., Girard B., Mazza G. 2002. Antimicrobial activity of individual and mixed fractions of dill, cilantro, coriander and eucalyptus essential oils. *International Journal of Food Microbiology*, 74: 101-109

Del Bano M.J., Lorente J., Castillo J., Benavente-Garcia O., Del Rio J.A., Ortuno A., Quirin K.W., Gerard D. 2003. Phenolic diterpenes, flavones, and rosmarinic acid distribution during the development of leaves, flowers, stems, and roots of *Rosmarinus officinalis*. Antioxidant activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51: 4247-4253

Del Bano M.J., Castillo J., Benavente -Garcia O., Lorente J., Martin-Gil R., Acevedo C., Alcaraz M. 2006. Radioprotective-antimutagenic effects of rosemary phenolics against chromosomal damage induced in human lymphocytes by γ -rays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54: 2064-2068

Del Campo J., Amiot M. J., Nguyen-The C. 2000. Antimicrobial effect of rosemary extracts. *Journal of Food Protection*, 10: 1359-1368

Diaz-Reinoso B., Moure A., Dominguez H., Parajo J.C. 2006. Supercritical CO₂ extraction and purification of compounds with antioxidant activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54: 2441-2469

- Dorman H.J.D., Deans S.G. 2000. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *Journal of Applied Microbiology*, 88: 308-316
- Dorman H.J.D., Peltoketo A., Hiltunen R., Tikkanen M.J. 2003. Characterization of the antioxidant properties of de-odorized aqueous extracts from selected Lamiaceae herbs. *Food Chemistry*, 83: 255-262
- Effler P., Jeong M. C., Kimura A., Nakata M., Burr R., Cremer E., Slutsker L. 2001. Sporadic *Campylobacter jejuni* infections in Hawaii: association with prior antibiotic use and commercially prepared chicken. *International Journal of Infections Diseases*, 183: 1152-1155
- Engberg J., Andersen R., Skov F., Aarestrup F. M., Gerner-Smidt P. 1999. Comparison of two agar dilution methods and three agar diffusion methods including the E test for antibiotic susceptibility testing of thermophilic *Campylobacter* species. *Clinical Microbiology and Infection*, 5: 580-584
- Engberg J., Aarestrup F.M., Taylor D.E., Gerner-Smidt P., Nachamkin I. 2002. Quinolone and macrolide resistance in *C. jejuni* and *C.coli*: Resistance mechanisms and trends in human isolates. *Emerging Infectious Diseases*, 7: 24-34
- Friedman M., Henika P. R., Mandrell R. E. 2002. Bactericidal activities of plant essential oils and some of their isolated constituents against *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, and *Salmonella enterica*. *Journal of Food Protection*, 10: 1545-1560
- Gilbert P., McBain A. J. 2003. Potential impact of increased use of biocides in consumer products on prevalence of antibiotic resistance. *Clinical Microbiology Reviews*, 2: 189-208
- Gould G.W. 2004. Microbiological and other aspects of food safety. V: Mikrobiologija in biotehnologija v proizvodnji varnih živil. Raspor P. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 1-10
- Gošnjak M. 2004. Spremembe zakonodaje za zagotavljanje mikrobiološke varnosti živil v luči evropskih zahtev. V: Mikrobiologija in biotehnologija v proizvodnji varnih živil. Raspor P. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 37-44
- Hadolin M. 2004. Izolacija in koncentriranje aktivnih učinkovin iz bioloških materialov. Doktorska disertacija. Univerza v Mariboru, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo: 113 str.
- Hakanen A., Jalava J., Kotilainen P., Jousimies-Somer H., Siitonen A., Huovinen P. 2003. Fluoroquinolone resistance in *Campylobacter jejuni* isolates in travelers returning to Finland: association of ciprofloxacin resistance to travel destination. *Emerging and Infectious Diseases*, 9: 267-270
- Halbert L.W., Kaneene J.B., Mansfield L.S., Ruegg P.L., Warnick L.D., Wells S.J., Fossler C.P., Campbell A.M., Geiger-Zwald N.M. 2005. Comparison of automated microbroth dilution for antimicrobial susceptibility of *Campylobacter jejuni* isolated from dairy sources. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 56: 686-691

- Hawkey P.M. 2003. Mechanisms of quinolone action and microbial response. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 51: 29-35
- Herpaz S., Glatman L., Drabkin V., Gelman A. 2003. Effects of herbal essential oils used to extend the shelf life of freshwater-reared Asian sea bass fish (*Lates calcalifer*). *Journal of Food Protection*, 66: 410-417
- Kosaka K., Yokoi T. 2003. Carnosic acid, a component of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.), promotes synthesis of nerve growth factor in T98G human glioblastoma cells. *Biological Pharmaceutical Bulletin*, 26: 1620-1622
- Kurinčič M., Berce I., Zorman T., Smole Možina S. 2005. The prevalence of multiple antibiotic resistance in *Campylobacter* spp. from retail poultry meat. *Food Technology and Biotechnology*, 43:157-163
- Kurinčič M., Medja B., Zorman T., Smole Možina S. 2006. Mechanisms of erythromycin and ciprofloxacin resistance in *Campylobacter jejuni* in *C. coli* from different sources. V: HDBMB 2006: Congress of the Croatian Society of Biochemistry and Molecular Biology on the occasion of the 30th Anniversary with international participation, Vodice, October 3-7, 2006. Book of abstracts. Kovarik Z. (ur.). Zagreb, Hrvatsko društvo za biokemiju i molekularnu biologiju:110-110
- Lee C.H., Han C.K., Tsau J.L. 2004. In vitro inhibitory activity of Chinese leek extract against *Campylobacter* species. *International Journal of Food Microbiology* 94: 169-174
- Liang Y. C., Lo A. H., Lin-Shiau S. Y., Ho C. T., Lin J. K. 2002. Carnosol, an antioxidant in rosemary, suppresses inducible nitric oxide synthase through down-regulating nuclear factor- κ B in mouse macrophages. *Carcinogenesis*, 6: 983-991
- Lin J, Michel L. O., Zhang Q. 2002. *CmeABC* functions as a multidrug efflux system in *Campylobacter jejuni*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 46: 2124-2131
- Lopez-Malo Vigil A., Palou E., Alzamora S.M. 2005. Naturally occurring compounds – plant sources. V: *Antimicrobials in food*. 3rd ed. Davidson P.M., Sofos J.N., Branen A.L. (eds.). Boca Raton, Taylor&Francis Group: 429-451
- Luber P., Bartelt E., Genschow E., Wagner J., Hahn H. 2003. Comparison of broth microdilution, E test and agar dilution methods for antibiotic susceptibility testing of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. *Journal of Clinical Microbiology*, 3: 1062-1068
- Luber P., Wagner J., Hahn H., Bartelt E. 2003. Antimicrobial resistance in *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* strains isolated in 1991 and 2001-2002 from poultry and humans in Berlin, Germany. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 12: 3825-3830
- Makino T., Ono T., Muso E., Yoshida H., Honda G., Sasayama S. 2000. Inhibitory effects of rosmarinic acid on the proliferation of cultured murine mesangial cells. *Nephrol Dial Transplant*, 15: 1140-1145
- McDermott P. F., Bodeis-Jones S. M., Fritsche T. R., Jones R. N., Walker J. D. 2005. Broth microdilution susceptibility testing of *Campylobacter jejuni* and the determination of quality

control ranges for fourteen Antimicrobial Agents. *Journal of Clinical Microbiology*, 43: 6136-6138

Moore J. E., Barton M. D., Blair I.S., Corcoran D., Dooley J. S. G., Fanning S., Kempf I., Lastovica A. J., Lowery C.J., Matsuda M., McDowell D. A., McMahon A., Millar B. C., Rao J. R., Rooney P. J., Seal B. S., Snelling W. J., Tolba O. 2006. The epidemiology of antibiotic resistance in *Campylobacter*. *Microbes and Infection*, 8: 1955-1966

Moreno S., Scheyer T., Romano C. S., Vojnov A. A. 2006. Antioxidant and antimicrobial activities of rosemary extracts linked to their polyphenol composition. *Free Radical Research*, 40: 223-231

Munne-Bosch S., Alegre L. 2001. Subcellular compartmentation of the diterpene carnosic acid and its derivatives in the leaves of rosemary. *Plant Physiology*, 125: 1095-1102

Nachamkin I. 1995. *Campylobacter* and *Arcobacter*. V: Manual of clinical microbiology. Murray P.R. (ed.). Washington, American Society for Microbiology: 483-491

Ninomiya K., Matsuda H., Shimoda H., Nishida N., Kasajima N., Yoshino T., Morikawa T., Yoshikawa M. 2004. Carnosic acid, a new class of lipid absorption inhibitor from sage. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 14: 1943-1946

Nostro A., Germano M.P., D'Angelo V., Marino A., Cannatelli M.A. 2000. Extraction methods and bioautography for evaluation of medicinal plant antimicrobial activity. *Letters in Applied Microbiology*, 30: 379-384

Olah P.A., Doetkott C., Fakhr M. K., Logue C. M. 2006. Prevalence of the *Campylobacter* multi-drug efflux pumps (CmeABC) in *Campylobacter* spp. isolated from freshly processed turkeys. *Food Microbiology*, 5: 453-460

Oyarzabal O.A. 2005. Reduction of *Campylobacter* spp. by commercial antimicrobials applied during the processing of broiler chickens: a review from the United States perspective. *Journal of Food Protection*, 8: 1752-1760

Payot S., Dridi S., Laroche M., Federighi M., Magras C. 2004. Prevalence and antimicrobial resistance of *Campylobacter coli* isolated from fattening pigs in France. *Veterinary Microbiology*, 101: 91-99

Petauer T. 1993. *Coriandrum sativum*. V: Petauer T. Leksikon rastlinskih bogastev. Ljubljana, Tehniška založba Slovenije: 151-151

Petersen M., Simmonds M.S.J. 2003. Rosmarinic acid. *Phytochemistry*, 62: 121-125

Piddock L.J.V., Ricci V., Pumbwe L., Evertt M.J., Griggs D.J. 2003. Fluoroquinolone resistance in *Campylobacter* species from man and animals: detection of mutations in topoisomerase genes. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 51: 19-26

Plouzek C.A., Ciolino H.P., Clarke R., Yeh G.C. 1999. Inhibition of P-glycoprotein activity and reversal of multidrug resistance in vitro by rosemary extract. *European Journal of Cancer*, 10: 1541-1545

The *Campylobacter* information site. 2000. Leicester, University of Leicester.
<http://www.le.ac.uk/genetics/ket/camhome.htm> (07.01.2006): 1. str

The genus *Campylobacter*. 2001. Denmark, European Union, Campynet, A network for the harmonisation and standardisation of molecular typing methods for *Campylobacters*.
<http://campynet.vetinst.dk/genus.htm> (07.01.2006): 4 str.

Threlfall E.J., Ward L.R., Frost J.A., Wilshaw G.A. 2000. The emergence and spread of antibiotic resistance in food-borne bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, 62: 1-5

Van Bambeke F., Balzi E., Tulkens P. M. 2000. Antibiotic efflux pumps. *Biochemical Pharmacology*, 60: 457-470

Walsh C. 2000. Molecular mechanisms that confer antibacterial drug resistance. *Nature*, 406: 775-781

Wannissorn B., Jarikasem S., Siriwangethai T., Thubthimthed S. 2004. Antibacterial properties of essential oils from Thai medicinal plants. *Fitoterapia*, 76: 233-236

Woods G. L., Washington J.A. 1999. Antibacterial susceptibility tests: dilution and disk diffusion methods. V: *Manual of clinical Microbiology*. Murray P. R., Baron E. J., Tenover M.A., Tenover F. C., Tenover F. C., Tenover R. H. (eds.). Washington, American Society for Microbiology: 1327-1341

Wren R.C., 1988. Rosemary. V: *New encyclopedia of botanical drugs and preparations*. 8th ed. England, Essex. Daniel C.W. (co.).
<http://www.traditionalmedicinals.com/index.php?title=rosemary> (15.02.2006)

Zorman T., Smole Možina S. 2002. Classical and molecular identification of thermotolerant *Campylobacters* from poultry meat. *Food Technology and Biotechnology*, 40: 177-184

Zorman T., Smole Možina S. 2004. *Campylobacter jejuni* in *Campylobacter coli* v piščančjem mesu: odkrivanje prisotnosti in identifikacija. V: *Varnost živil, 22. Bitenčevi živilski dnevi 2004*. Gašperlin L., Žlender B. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta: 297-302

ZAHVALA

Mentorici prof. dr. Sonji Smole Možina se najlepše zahvaljujem za strokovno vodenje, pomoč in nasvete pri opravljanju diplomskega dela.

Hvala recenzentki prof. dr. Veroniki Abram za skrben in natančen pregled diplomskega dela.

Velika hvala Mariji Kurinčič za dobro voljo, pomoč v laboratoriju in strokovne nasvete med pisanjem diplomskega dela.

Zahvala gre tudi Jani Avbelj za pomoč v laboratoriju.

Hvala Ivici Hočevar in Barbari Slemenik za pomoč pri iskanju in natančnem urejanju virov.

Mami, oči in Ana, hvala za ker ste mi vsa leta študija stali ob strani in me vzpodbujali tudi kadar mi ni šlo najbolje.